



Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos modificado

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

Bibiana Andreia Moreira Assunção

Porto, 2016

ORIENTADORES

Orientador: Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes

Professor Catedrático da FMDUP

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Mariana Contente Rangel Henriques

Professora Auxiliar da UMinho

Membros o Conselho Científico

da Faculdade Medicina Dentária da Universidade do Porto

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira
Prof. Doutor António Cabral de Campos Felino
Prof. Doutor António Marcelo Azevedo Miranda
Prof. Doutora Ana Paula Coelho Macedo Augusto
Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal da Silva
Prof. Doutor Filipe Poças de Almeida Coimbra
Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha
Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz
Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas
Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes
Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho
Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes
Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas
Prof. Doutora Maria Benedita Almeida Garrett de Sampaio Maia Marques
Prof. Doutora Maria Cristina Pinto Coelho Mendonça de Figueiredo Pollmann
Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva
Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes
Prof. Doutora Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira
Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes da Silva
Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos
Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto
Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo
Prof. Doutor Pedro Manuel Vasconcelos Mesquita
Prof. Doutor Pedro de Sousa Gomes
Prof. Doutor Ricardo Manuel Casaleiro Lobo de Faria e Almeida

Docentes Jubilados

Da Faculdade Medicina Dentária da Universidade do Porto

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira (Professor Catedrático)
Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira (Professor Associado †)
Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas (Professor Associado †)
Prof. Dr Artur Rego Alves Pinho (Professor Auxiliar Convidado)
Dr. António Ulisses Matos dos Santos (Assistente Convidado)
Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira (Professor Associado c/ Agregação)
Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas (Professor Catedrático)
Dr. José Maria Vaz Osório (Assistente Convidado †)
Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves (Professor Catedrático)
Prof. Doutor Manuel Desport Marques (Professor Associado Convidado †)
Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo (Professor Associado)

Docentes aposentados Da Faculdade Medicina Dentária da Universidade do Porto

Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas (Professor Auxiliar)
Prof. Dr. Artur Manuel Osório de Araújo (Professor Associado Convidado)
Prof. Doutor Fernando Jorge Morais Branco (Professor Catedrático)
Prof. Doutor Fernando José Brandão Martins Peres (Professor Catedrático †)
Prof. Doutor José Albertino Cruz Lordelo (Professor Associado c/ Agregação)
Prof. Doutor José Carlos Pina Almeida Rebelo (Professor Catedrático)
Prof. Doutor Manuel Pedro da Fonseca Paulo (Professor Catedrático)
Prof. Doutora Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas (Professora Associada †)
Prof. Doutora Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares (Professora Catedrática)
Prof. Doutor Rogério Serapião Martins Aguiar Branco (Professor Catedrático)

Dedico este trabalho aos meus pais, Miguel Silva
e Eugénia Assunção, pelo exemplo de
vida, carinho, educação e amor
incondicional.

O agradecimento sempre será pouco...

Aos meus mestres

Aos docentes da Faculdade

De Medicina Dentária da

Universidade do Porto

Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, certamente não me permitirá agradecer, como deveria, a todas as pessoas que ao longo do meu Mestrado em Reabilitação Oral na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto me ajudaram direta ou indiretamente, a almejar os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica.

Deste modo, deixo apenas algumas singelas palavras no sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, instituição pilar do meu conhecimento e a qual ofereceu as bases científicas para a elaboração deste trabalho.

Ao meu Orientador, Prof. Doutor Sampaio Fernandes, a quem admiro muito, pela seriedade, competência e exemplo profissional. Agradeço pelo momento em que aceitou orientar-me, pelos ensinamentos transmitidos e incansável disponibilidade. Graças à sua devoção pela educação, inspirou-me a ingressar nos caminhos da ciência. Agradeço também a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À minha Co-orientadora, Prof.^a Doutora Mariana Henriques, pela receptividade e satisfação em orientar sempre. Agradeço pela dedicação como orientadora e pelo auxílio imprescindível no meu desenvolvimento científico e intelectual. Muito obrigada pela transmissão de profissionalismo, de rigor e de competência na investigação científica. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese.

Ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, em particular à Professora Mariana Henriques e à Doutora Célia Fortuna Rodrigues, a quem agradeço todo o auxílio e apoio manifestados ao longo deste Projeto. Obrigada pela amabilidade e cuidado na preparação das amostras necessárias para a elaboração desta investigação. Assim como, o auxílio na execução dos estudos microbiológicos. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição.

À Professora Doutora Ana Cristina Braga, por toda a ajuda e empenho constante. A sua sabedoria foi essencial para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação.

Ao Professor Doutor José Mário Rocha, parcas são as palavras que posso proferir para agradecer todo o conhecimento científico que me transmitiu ao longo de toda a minha vida académica.

Ao Professor Doutor César Leal da Silva, agradeço a motivação e estímulo e as palavras dinamizadoras com que sempre me agraciou.

À Professora Doutora Helena Figueiral, agradeço a constante motivação e estímulo para a realização desta tese de Mestrado.

Ao Professor Doutor António Cabral de Campos Felino, por ter sido tão importante na minha formação académica. É com muita admiração que lhe agradeço o estímulo sempre tão eficazmente provocador de crescimento pessoal.

Ao Sr. Pedro Vilela, agradeço a disponibilização do condicionador de tecidos UFI Gel SC[®] para a execução deste projeto de investigação

À D. Idalina Vaz, pela amabilidade, colaboração, disponibilidade e competência no auxílio durante a frequência do Mestrado em Reabilitação Oral da FMDUP.

À Dra. Carla Pinto, agradeço pela motivação, disponibilidade, amabilidade e competência sempre presentes, sobretudo nos momentos de desânimo.

À D. Delfina Alves, o meu agradecimento pela disponibilidade e competência inextinguíveis na recolha das referências bibliográficas.

Aos meus colegas de Mestrado e Especialização, em particular o Carlos, a Lília, a Joana e a Catarina, um muito obrigado pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse com particular motivação.

Ao meu namorado, por sempre ter acreditado em mim e pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis durante este longo percurso.

À minha querida irmã, pelo estímulo constante e empenho em ajudar nos momentos difíceis.

À minha mãe, exemplo de integridade, força interior, carácter, justiça, esperança e amor em todos os momentos da minha vida. Pelo grande incentivo que sempre recebi, sem o qual a maioria das minhas conquistas não seriam possíveis.

Aos pacientes, motivo da existência desta faculdade e profissão, que depositam confiança e esperança nas nossas mãos frente aos seus problemas de saúde, o meu muito obrigado!

Aos alunos e funcionários da FMDUP.

Aos meus colegas e amigos.

ÍNDICE FIGURAS	11
ÍNDICE TABELAS	13
ABREVIATURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1.INTRODUÇÃO.....	18
INTRODUÇÃO	19
○ 1.1.CONDICIONADORES DE TECIDOS.....	19
○ 1.2.ESTOMATITE PROTÉTICA.....	21
○ 1.3.BIOFILME	25
○ 1.4.TERAPÊUTICA DA CANDIDÍASE ATRÓFICA CRÓNICA.....	26
○ 1.5.OBJETIVOS E JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO	31
2.MATERIAL E MÉTODOS	32
○ 2.1.ESCOLHA DA AMOSTRA E MATERIAL	33
○ 2.2. PREPARAÇÃO DO INÓCULO, CILINDROS DE CONDICIONADOR TECIDOS E APLICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS	35
○ 2.3.ANÁLISE DO EFEITO DOS ANTIMICROBIANOS	40
○ 2.4.TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3.RESULTADOS..	42
4.DISSCUSSÃO	52
5.CONCLUSÕES	56
6.LINHAS DE INVESTIGAÇÃO FUTURA	58
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1 - Efeito "almofada" do condicionador de tecidos. Fonte: http://www.ausdcc.com.au/attachments/Image/DSCN3008.jpg (sem autorização do autor).....	19
Figura 2 - Aplicação do Condicionador de Tecidos. Pormenor da consistência de gel. Fonte: https://www.dmg-dental.com/fileadmin/user_upload/products/Silagum-Comfort/Silagum-Comfort_2.jpg (Sem autorização do autor)	20
Figura 3 - Estomatite protética no maxilar superior. Fonte: http://2.bp.blogspot.com/-9tEXAOeetj4/UuhM_b6Ajnl/AAAAAAAAAlo/e4lse-EgCl8/s1600/Estomatite+prot%C3%A9tica.JPG (sem autorização do autor)	24
Figura 4 - Condicionador de Tecidos Ufi Gel SC da VOCO GmbH® (Germany). Fonte: com autorização do autor.....	33
Figura 5 - A - Mycostatin® Nistatina 100.000 U.I./ml; B – Diflucan® Fluconazol 2mg/ml; C - Sporanox® Itraconazol 10mg/ml Solução Oral; D - Paradontax® 0,2% Clorhexidina Fonte: com autorização do autor.	33
Figura 6 – C. albicans SC5314	35
Figura 7 - Preparação pré-inóculo de C. albicans SC5314.....	36
Figura 8 - A - Execução das perfurações usando a biopsia por aspiração. B - Pormenor da perfuração.	36
Figura 9 - Cilindros de condicionador de tecidos Ufi Gel SC.	37
Figura 10 - Colocação dos cilindros de condicionador nos poços com os agentes antifúngicos.....	38
Figura 11 - Processo de agitação para incorporação dos agentes antifúngicos.....	38
Figura 12 - Colocação dos cilindros de condicionador de tecidos modificado no meio cultura SDA.	39
Figura 13 - Colocação das placas na estufa a 37°C.	39
Figura 14 – Representação esquemática de inoculação em placas de petri com UFI Gel SC modificado com agentes antifúngicos. Fonte: Adaptado de Sharma et al., 2014 (Sem autorização do autor).	40
Figura 15 - Esquematização da distribuição dos cilindros de condicionador de tecidos para a incorporação dos antimicrobianos. Todos os ensaios foram repetidos em triplicado durante 3 semanas diferentes.	41
Figura 16 - Imagem da superfície da placa durante o período de incubação utilizando apenas os antimicrobianos para controlo.	45
Figura 17 - Imagem da superfície da placa durante o período de incubação do condicionador de tecidos com incorporação de 30s de cada fármaco.	46
Figura 18 – Imagem da superfície da placa durante o período de incubação do condicionador de tecidos com incorporação de 1min. de cada fármaco.	47
Figura 19 – Gráfico de perfil para o valor médio dos halos ao longo dos 3 períodos para cada fármaco.	49

Figura 20 – Gráfico de perfil para o valor médio dos halos ao longo dos 3 períodos para cada incorporação.....	49
Figura 21 – Gráfico de perfil para o valor médio dos halos ao longo dos 3 períodos para cada combinação fármaco e incorporação.	50

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1 - Composição, Fabrico e Número de lote dos materiais (condicionador de tecidos, Clorhexidina, Fluconazol, Nistatina e Itraconazol) usados no estudo.....	34
Tabela 2 - Descritivas para variável dependente (halos) segundo o antimicrobiano e o tempo de incorporação.....	44
Tabela 3 - Testes de efeitos intra-sujeitos (para halos).	48
Tabela 4 – Teste aos efeitos dos fatores.....	51
Tabela 5 – Comparações múltiplas entre os antifúngicos usados aplicando o teste de Bonferroni.....	51
Tabela 6 - Comparações múltiplas entre os tempos de incorporação dos antifúngicos aplicando o teste de Bonferroni.....	51

ABREVIATURAS

CHX - Clorhexidina

FLU - Fluconazol

FMDUP - Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

ITRA - Itraconzol

MIC - Concentrações mínimas inibitórias

NCAC - Espécies *Candida* não-*Candida albicans*

NYS - *Nistatina*

SDA - *Sabouraud* dextrose agar

UMinho - Universidade do Minho

RESUMO

Introdução: Os condicionadores de tecidos são geralmente utilizados em próteses acrílicas removíveis na prática clínica diária, no sentido de melhorar a adaptação da prótese e permitirem a recuperação dos tecidos suporte. É, sobretudo, pela propriedade elástica dos condicionadores de tecidos, que se traduz pela atuação do tipo “almofada” para as forças exercidas durante a mastigação, que se obtém a recuperação dos tecidos. No entanto, estes condicionadores de tecido também são bem conhecidos pelas suas pobres propriedades físicas e biológicas - fácil degradação e colonização por microrganismos. Assim verifica-se que, as características destes materiais rebasadores favorecem a acumulação de placa bacteriana e a colonização por espécies de *Candida*, que podem mesmo irritar os tecidos orais e condicionarem o desenvolvimento da estomatite protética, colocando em risco a saúde oral dos portadores de prótese dentária. Inclusivamente demonstrou-se que estas resinas acrílicas, quando colocadas na base da prótese, podem atuar como reservatório para microrganismos e têm o potencial para a formação de biofilme. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos disponível no mercado, combinado com fármacos antifúngicos para inibir a colonização por espécies de *Candida*.

Material e métodos: A amostra deste estudo foi composta de 108 discos (controlo, Fluconazol, Itraconazol; Nistatina e Clorhexidina) - cilindros 6mmx5mm de condicionador de tecido, Ufi Gel® SC VOCO auto-mix, a fim de garantir a mistura uniforme, de acordo com as instruções do fabricante. 2mg Fluconazol / mL (Diflucan®), 0,2% de Clorhexidina a 0,2% (Paradontax®), Nistatina 100,000 UI / mL (Micostatina®) ou Itraconazol 10 mg / mL solução oral (Sporanox®) foram adicionados nos cilindros do condicionador de tecido e mantidos com agitação durante 30 s e 1 min. Os cilindros foram colocados numa placa de Sabouraud Dextrose Agar (SDA) previamente incorporados com *Candida albicans* SC5314, 37 ° C. A avaliação dos efeitos de modificação do condicionador de tecidos foi realizada pelo teste de halo, durante 7 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicado em 3 semanas diferentes.

Resultados e Discussão: Pelos resultados obtidos verificou-se que, quando incorporado nos condicionadores, o Fluconazol tem a eliminação de *C. albicans* mais evidente. O teste de halo revelou para os discos com Fluconazol o melhor desempenho durante ao 7º dia. O facto de a Clorhexidina ter PEG-40 na sua composição, aumenta o seu efeito molhante, o que pode ter efetivamente aumentado a sua atividade relativamente ao controlo isolado, sendo claramente benéfico na incorporação de Clorhexidina no condicionador de tecido.

Conclusões: A incorporação de fármacos antifúngicos no condicionador de tecido teve efeito fungicida. O efeito antifúngico do condicionador de tecido modificado por Fluconazol foi superior ao dos outros fármacos. No entanto, esta hipótese ainda não está totalmente esclarecida e há algumas dúvidas, por isso, é urgente que mais estudos clínicos sejam desenvolvidos a fim de esclarecer e ajudar o dentista no planeamento do tratamento.

Palavras-chave: Condicionador de Tecidos; Agentes antifúngicos; *Candida albicans* / efeitos de fármacos; estomatite protética

ABSTRACT

Introduction: Tissue conditioners are generally used in acrylic removable dentures to improve the fit of the prosthesis and to allow support tissues recovery. It is mostly by the elastic property of the conditioners, which translates the performance of the "cushion" effect by the forces exerted during mastication, which is obtained the tissue recovery. However, these tissue conditioners are also well known for its poor physical properties - easy sensitivity degradation and colonization by microorganisms. Thus, their characteristics favor the accumulation of plaque and colonization by species of *Candida*, which can irritate the oral tissues and promote the development of denture stomatitis, threatening the oral health of patients with removable dental prosthesis. It was shown that these same acrylic resin when placed at the base of the prosthesis, could act as a reservoir for microorganisms and have the potential for biofilm formation. This work aimed to evaluate the antimicrobial activity of a tissue conditioner available in the market, combined with antifungal drugs to inhibit colonization by *Candida* species.

Material and methods: A sample of this study was comprised of 108 discs (control, Fluconazole; Itraconazole; Nystatin and chlorhexidine) - 6mmx5mm cylinders of tissue conditioner, Ufi Gel® SC VOCO self-mix, in order to guarantee the uniform mixture, according to manufacturer's directions. Fluconazole 2mg/mL (Diflucan®), 0.2% Chlorhexidine 0.2% (Paradontax®), Nystatin 100.000 U.I./ml (Mycostatin®) or Itraconazole 10mg/ml Oral solution (Sporanox®) were added to the tissue conditioner cylinders and kept with agitation for 30s and 1 min. The cylinders were a plate of DSA previously incorporated with *Candida albicans* SC5314, 37 ° C. The assessment of the effects of modification of the tissue conditioner was performed by halo test for 7 days. All assays were performed in triplicate in 3 different weeks.

Results and Discussion: From the results obtained it was found that, when incorporated in conditioners, Fluconazole has the elimination of *C. albicans* more evident. The halo test revealed for the discs with Fluconazole the best performance during the 7th day. The fact that of Chlorhexidine has PEG-40, in its composition increases the effect "wetting", which was clearly beneficial in incorporation of Chlorhexidine in the tissue conditioner.

Conclusions: The incorporation of antifungal drugs in tissue conditioner had fungicidal effect. The antifungal effect durability on the modified tissue conditioner by the Flu was superior to the other drugs. However, this hypothesis is not yet fully clarified and there are some doubts, so it is urgent that further clinical studies are developed in order to clarify and assist the dentist in planning treatment.

Keywords: Tissue Conditioning (Dental); Antifungal Agents; *Candida albicans*/drug effects; denture stomatitis

1.INTRODUÇÃO

“Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos modificado”

INTRODUÇÃO

1.1. CONDICIONADORES DE TECIDOS

Os condicionadores de tecidos são geralmente utilizados em próteses acrílicas removíveis na prática clínica diária, no sentido de melhorar a adaptação da prótese e permitirem a recuperação dos tecidos suporte. (Figueiral MH. *et al.*, 1997; Urban VM, *et al.*, 2009; Marra J., *et al.*, 2012; Sharma S., *et al.*, 2014). A maioria das indicações para utilização dos condicionadores de tecidos resumem-se a: adaptação provisória de uma prótese antiga enquanto se confeciona uma nova prótese; após cirurgia oral na região abrangida pela prótese; durante o período de tratamento de uma estomatite protética, isoladamente ou em combinação com antifúngicos tópicos ou sistêmicos. (Figueiral MH. *et al.*, 1997)

É, sobretudo, pela propriedade elástica dos condicionadores de tecidos, que se traduz pela atuação do tipo “almofada” (Figura 1) para as forças exercidas durante a mastigação, que se obtém a recuperação dos tecidos. (Sharma S., *et al.*, 2014). Assim, este tipo de materiais rebasadores moles têm sido amplamente empregues de forma terapêutica na prática clínica, por amortecerem, em parte, os impactos mastigatórios, podendo ser classificados como de uso prolongado (meses) ou de tratamento imediato (dias). (Rocha DM., *et al.*, 2009)



Figura 1 - Efeito "almofada" do condicionador de tecidos. Fonte: <http://www.ausdcc.com.au/attachments/Image/DSCN3008.jpg> (sem autorização do autor).

Durante a prática clínica é relativamente comum observarem-se inflamações de diversos graus de intensidade na mucosa que reveste o rebordo alveolar desdentado, sob próteses totais e/ou próteses parciais removíveis. Na maioria dos casos estes processos inflamatórios ocorrem pela má adaptação das próteses dentárias, promovendo a sobrecarga dos tecidos subjacentes. (Rocha DM., *et al.*, 2009)

Os primeiros estudos relativos a condicionadores de tecido verificaram-se partir de 1970, quando Braden analisou as propriedades dos condicionadores de tecidos e observou que os mesmos consistiam num pó polímero poli (etilmetacrilato ou polímeros) e num líquido. Esta mistura era de um éster aromático e de 30% etanol, dando lugar a um gel (Figura 2), que possibilitava um material absorvedor de impacto. (Braden M. 1970; Rocha DM., *et al.*, 2009)

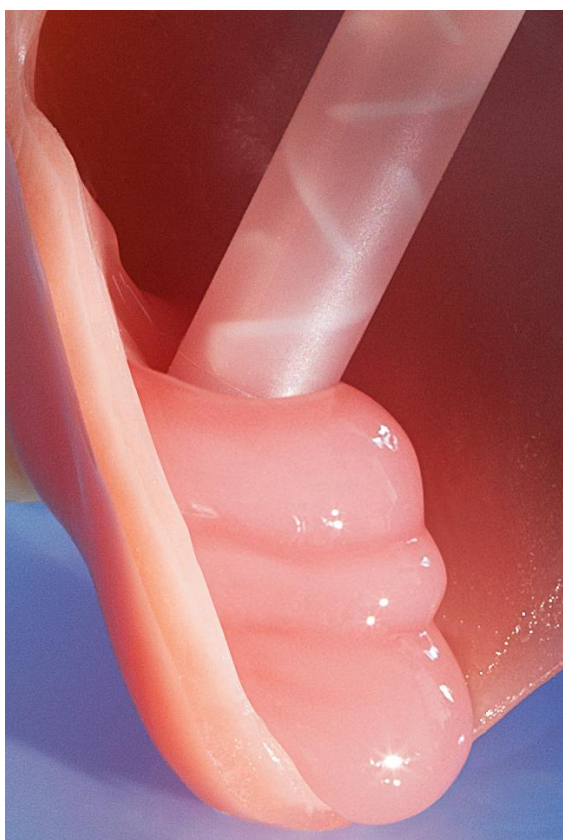


Figura 2 - Aplicação do Condicionador de Tecidos. Pormenor da consistência de gel. Fonte: https://www.dmg-dental.com/fileadmin/user_upload/products/Silagum-Comfort/Silagum-Comfort_2.jpg (Sem autorização do autor)

Adicionalmente, Braden e Causton também estudaram as propriedades destes materiais, constatando que a mistura apresentava um comportamento de líquido viscoso. (Braden M. 1970^a; Rocha DM., *et al.*, 2009)

Os materiais rebasadores normalmente usados têm como base resinas acrílicas ou silicones. (Bertolini MM. *et al.*, 2014; Rueggeberg F. *et al.*, 2002; Pisani MX. *et al.*, 2012)

Os materiais à base de resinas podem ser termoativados ou quimicamente ativados, e, estes, geralmente possuem poli (metilmetacrilato) ou poli (etilmetacrilato) como principal componente estrutural. O plastificador, componente que atrasa a reação polimerização, geralmente é o dibutilftalato. (Rocha DM., *et al.*, 2009)

O efeito resultante da reação é uma resina macia, de curta duração, chamada de condicionador de tecidos. Os condicionadores de tecidos são materiais caracteristicamente temporários, cuja utilização deve ser limitada ao tempo necessário para obtenção de saúde tecidular. (Rocha DM., *et al.*, 2009)

Todavia, os condicionadores de tecidos são, também, sobejamente conhecidos pelas suas pobres propriedades físicas (Skupien JA *et al.*, 2003) - fácil degradação e sensibilidade à colonização por microrganismos. (Urban VM, *et al.*, 2009) Contudo, os procedimentos regulares de higienização protética e os próprios produtos de limpeza para próteses podem promover uma deterioração significativa da superfície destes materiais (Brozek R. *et al.*, 2007; Brozek R. *et al.*, 2008; Brozek R. *et al.*, 2011), conduzindo a um aumento da rugosidade e criando irregularidades que facilitam a aderência de microrganismos orais. (Bertolini MM. *et al.*, 2014)

Assim verifica-se que, as características destes materiais rebasadores favorecem a acumulação de placa bacteriana e a colonização por espécies de *Candida*, que podem mesmo irritar os tecidos orais e condicionarem o desenvolvimento da estomatite protética, colocando em risco a saúde oral dos portadores de prótese dentária. (Toda C., *et al.*, 2015; Skupien JA *et al.*, 2003; Nikawa H. *et al.*, 2003; Boscato N. *et al.*, 2009; Monsenego P. *et al.*, 2000)

Inclusivamente demonstrou-se que estas resinas acrílicas, quando colocadas na base da prótese, podem atuar como reservatório para microrganismos e têm o potencial para a formação de biofilme. (Figueiral MH. *et al.*, 1997; Marra J., *et al.*, 2012; Radnai M. *et al.*, 2010)

1.2. ESTOMATITE PROTÉTICA

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento significativo da incidência das infeções fúngicas nos seres humanos. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009; Garcia-Cuesta C. *et al.*, 2014). Vários são os fatores que foram apontados como contribuidores para este incremento, no entanto, de um modo geral, tem-se encontrado relacionado com novas práticas médicas, como a utilização de antibióticos de largo espectro de ação, fatores dietéticos, problemas endócrinos, deficiências no nível do sistema imunitário e procedimentos cirúrgicos mais invasivos. (Ten Cate JM., *et al.*, 2009; Lalla RV *et al.*, 2009)

A *Candida* é um grupo taxonómico que foi originalmente utilizado para definir um conjunto de organismos que foram considerados como não tendo um ciclo sexual reprodutivo. Apesar do género

Candida conter 350 espécies heterogêneas, apenas uma minoria dá origem a patologia. (Ten Cate JM., et al., 2009; Silva S et al.,2009)

As infecções causadas por espécies de *Candida* são designadas por candidoses ou candidíases. (Ten Cate JM., et al., 2009; Lalla RV et al.,2009; Silva S et al.,2009; Henriques M., et al., 2006) Esta condição é geralmente assintomática, embora possa ser associada a sintomas clínicos como a sensação de queimadura, dor ou disfagia. (Silva S et al., 2009; Falah-Tafti A. et al., 2010) Este fungo é ainda considerado como o mais relevante na área da Medicina Dentária em termos de patologias associadas (Lalla RV et al., 2009) e a candidíase é a infecção fúngica mais frequente da cavidade oral. (Afonso A. et al.,1993) Apesar desta realidade, normalmente, a infecção por *Candida* não ocorre em hospedeiros que respondem imunologicamente de forma eficiente (imunidade inata e adaptativa). (Rautemaa R. et al., 2011; McCullough MJ et al., 2005) Mas ocorre frequentemente em pacientes imunologicamente debilitados, tais como pacientes oncológicos, transplantados, entre outros. (Ten Cate JM. et al., 2009; He H. et al., 2010; Dar MS. et al., 2015)

Das espécies de *Candida* isoladas de amostras de seres humanos, a *Candida albicans* mostrou ser a mais prevalente, tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos doentes. (Ten Cate JM. et al., 2009; Farah CS. et al., 2010; Silva S et al.,2009; Henriques M. et al., 2006)

Estudos realizados na área da micologia demonstraram que a *C. albicans* representa 80% das espécies isoladas das candidíases humanas, sendo das mais virulentas de entre estas. (Rautemaa R. et al., 2011) Porém, tem-se verificado que as espécies não-*Candida albicans* (NCAC) são também agentes determinantes nas infecções humanas. (Ten Cate JM. et al., 2009; Dar MS. et al., 2015)

Entre as NCAC encontram-se a *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. darapsilosis*, *C. tropicalis*, entre outras que tem vindo ser descritas com um aumento da sua prevalência. (Lalla RV. et al., 2009; Henriques M. et al., 2006)

A espécie NCAC mais semelhante à *C. albicans* é a *C. dubliniensis* que, devido à grande analogia ao seu genótipo e fenótipo, levou a que se confundissem durante anos. Esta espécie, *C. dubliniensis*, adere muito fortemente ao epitélio oral, sendo que algumas estirpes desta espécie foram consideradas resistentes a um dos princípios ativos mais utilizados no tratamento das Candidíases Orais - Fluconazol (FLU). Esta resistência era particularmente problemática em indivíduos infetados HIV positivos infetados com esta estirpe, na medida em, que mesmo mantendo a terapêutica com Fluconazol a longo prazo, não era possível atingir a supressão de *Candida*. Apesar disto, esta suscetibilidade antifúngica, não era tão forte como ocorria nos casos de infecção por *C. krusei* e *C. glabrata*. O aumento de infecções sistémicas por *C. glabrata* tem vindo, aliás, a constituir motivo de preocupação, uma vez

que esta desenvolve rapidamente resistência aos antifúngicos da classe dos azóis. Além disso, as infecções por *C. glabrata* tem sido associadas a uma taxa de mortalidade elevada em pacientes imunologicamente comprometidos. (Lalla RV. *et al.*, 2009; Silva S. *et al.*, 2009)

Acredita-se que aumento do envolvimento destas espécies supramencionadas se deva a avanços nos métodos de diagnóstico assim como à introdução de técnicas moleculares, que permitem diferenciar espécies, facilitando o diagnóstico de infecções fúngicas. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009; McCullough MJ. *et al.*, 2005; He H. *et al.*, 2010)

No que diz respeito à virulência atribuída às espécies de *Candida*, estas tem vindo a constituir objeto de estudos recentes, nomeadamente quanto às suas capacidades de adesão à superfície dos tecidos, de exibição de uma alteração morfológica e de segregação de enzimas hidrolíticas. (McCullough MJ. *et al.*, 2005; Lalla RV *et al.*, 2009)

Fato é que as diferentes espécies de *Candida* fazem parte do biofilme dentário existente na cavidade oral. Portanto, aderem não só às superfícies dentárias como também a dispositivos médicos, como a superfície de próteses acrílicas. A *Candida* presente na cavidade oral pode atuar como reservatório para a inoculação de infecções em qualquer outro local do organismo, residindo aí a sua grande importância. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009)

Foi descrita uma relação da expressão de fatores de virulência e da debilidade do hospedeiro com a mudança ocorrida nas espécies de *Candida* - estas deixam de ser comensais e passam a condicionar doença. (McCullough MJ. *et al.*, 2005; Naglik JR *et al.*, 2011)

Uma prótese removível colocada na cavidade oral poderá induzir diversas alterações na microbiota oral e inerentes à mesma a infecção crónica da mucosa que suporta a respetiva prótese removível. (Sharma S. *et al.*, 2014)

Uma das complicações mais comuns do uso de próteses é o desenvolvimento de um tipo de candidíase - candidíase atrófica crónica, conhecida também como estomatite protética, descrita como prevalente em 11% a 67% dos portadores de próteses totais. (Sharma S., *et al.*, 2014; Wilson J. *et al.*, 1998; Budtz-Jørgensen E. *et al.*, 1996; Espinoza I. *et al.*, 2003)



Figura 3 - Estomatite protética no maxilar superior. Fonte: http://2.bp.blogspot.com/-gtEXAOeetj4/UuhM_b6AjnI/AAAAAAAAAIo/e4lse-EgCl8/s1600/Estomatite+prot%C3%A9tica.JPG (sem autorização do autor)

Esta estomatite protética (Figura 3) é descrita como uma condição inflamatória crônica do palato e da mucosa alveolar subjacentes a próteses dentárias removíveis, sendo mais comumente observada na mucosa maxilar. (Falah-Tafti A. *et al.*, 2010; Afonso A. *et al.*, 1993)

Com o uso contínuo de uma prótese, a base da prótese e o espaço entre a mucosa e a superfície da prótese fornecem um refúgio para os potenciais agentes patogênicos, propiciando-se a colonização e proliferação de microrganismos. Três graus de gravidade da estomatite protética foram identificados por Newton: Tipo I (eritematosa localizada), Tipo II (difusa eritematosa), e Tipo III (granular hiperplásica), sendo o último o mais grave. (Newton AV. 1962; Sharma S. *et al.*, 2014)

De fato, a estomatite protética possui uma etiologia multifatorial. Os fatores predisponentes incluem: traumatismo local produzido por próteses (sobretudo quando mal-adaptadas), ausência de higienização da prótese, doenças sistêmicas e/ou doenças crônicas (*e.g* diabetes mellitus), xerostomia, uso contínuo da prótese sem a remoção, e um sistema imunológico comprometido. (Afonso A. *et al.*, 1993; Sharma S. *et al.*, 2014; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010; Fanello S. *et al.*, 2006)

Apesar de apresentar uma etiologia de cariz multifatorial, na estomatite protética, a *C. albicans* tem sido estabelecida como o microrganismo patogénico primário, regularmente isolado a partir de pacientes que sofrem de estomatite protética. A *C. albicans* é um organismo comensal, normal na cavidade oral, mas que pode adquirir patogenicidade em determinadas situações, nomeadamente em casos de imunodeficiência e / ou irritação local crónica. (Sharma S., *et al.*, 2014; Bertolini MM. *et al.*, 2014)

Um dos passos iniciais na prevenção e tratamento de estomatite protética é melhorar a adaptação da prótese e preparar as condições para a recuperação dos tecidos suporte de prótese. (Chander S. *et al.*, 2007; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010)

Assim, considera-se que um plano de tratamento para estomatite protética deverá incluir a substituição da prótese antiga, a eliminação de anatómica de irregularidades, o estabelecimento de oclusão não-traumática, a restituição nutricional, a instituição de instruções sobre higiene oral, a avaliação das doenças sistémicas e o tratamento antifúngico. (Sharma S., *et al.*, 2014)

1.3. BIOFILME

O biofilme microbiano oral pode ser definido como uma comunidade bacteriana ou fúngica estruturada tridimensionalmente e ligada a uma superfície sólida, como o esmalte dos dentes, a superfície da raiz ou outros materiais, incorporados numa matriz extracelular de polissacarídeos, produzida por estes mesmos microrganismos. (Zijng V. *et al.*, 2010)

Tem também sido sugerido que as espécies de *Candida* com elevada habilidade para formar biofilme são geralmente mais virulentas que as outras. Estas espécies podem aderir à superfície de próteses acrílicas e a silicones, conseguindo assim promover a formação de biofilmes. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009; Lalla RV *et al.*, 2009)

A presença de uma prótese dentária constitui um fator para o aparecimento de candidíase, sendo mais frequentemente encontrada numa prótese maxilar superior. As espécies de *Candida* aderem facilmente ao polimetacrilato e estudos recentes demonstraram que além disso, estas leveduras podem utilizar a presença de microfissuras e falhas no material protético, de modo a permitir a retenção e a propagação do biofilme. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009)

Na candidíase eritematosa crónica, a superfície da prótese atua como um reservatório de infeção, contendo células de *Candida* que, devido à sua proximidade à mucosa do palato, está mais suscetível para causar infeção neste local. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009)

Normalmente, a superfície da mucosa possui uma barreira efetiva contra infecção, no entanto, quando uma prótese se encontra mal-adaptada pode causar fricção e irritação na mucosa palatina e assim facilitar a invasão de espécies de *Candida* nas camadas mais superficiais do epitélio. (Ten Cate JM. *et al.*, 2009)

O crescimento microbiano na superfície das próteses resulta da capacidade de adesão das células microbianas, potenciada pela rugosidade da superfície e interações de adesão entre as espécies de *Candida* e bactérias orais. (Marra J. *et al.*, 2012)

Vários estudos têm demonstrado uma associação entre *C. albicans* ou outras espécies de *Candida*, e várias bactérias orais, tais como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces viscosus*. (Marra J. *et al.*, 2012; Nair RG. *et al.*, 1996; Zamoerini CA *et al.*, 2010) Estes microrganismos podem induzir uma resposta inflamatória crónica na mucosa oral, descrita como estomatite protética (a doença infecciosa mais comum que afeta a mucosa oral e altamente prevalente em indivíduos portadores de prótese). (Marra J., *et al.*, 2012; Garcia-Cuesta C. *et al.*, 2014)

C. albicans e *Staphylococcus aureus* também têm sido associados a lesões em vários pacientes com queilite angular, uma vez que estes microrganismos apresentam uma elevada capacidade de aderir aos tecidos orais. (Marra J., *et al.*, 2012)

A candidíase oral é um tipo de estomatite protética que tem sido fortemente associada à presença de espécies de *Candida*, sendo a *C. albicans* o principal agente etiológico descrito dentro deste género de estomatite. (Skupien JA *et al.*, 2003)

1.4. TERAPÊUTICA DA CANDIDÍASE ATRÓFICA CRÓNICA

O tratamento habitual da estomatite protética compreende a eliminação do agente infeccioso e das suas fontes, incluindo por isso os tecidos orais (por terapia antifúngica) e a própria prótese (limpeza e desinfecção). (Urban VM. *et al.*, 2009) Os três principais grupos de fármacos antifúngicos utilizados para reduzir o crescimento excessivo de espécies de *Candida* são: os polienos (Anfotericina B e Nistatina), os azóis (Miconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol), e os antissépticos, tais como o Gluconato de Clorhexidina (CHX). No entanto, a estomatite protética induzida por espécies de *Candida* é mais comumente tratada com agentes antifúngicos de polieno, que são aplicados na região infetada e podem ser aplicadas na superfície da prótese antes da inserção na cavidade oral. (Urban VM, *et al.*,

2009) A terapêutica antifúngica deve ser iniciada se forem identificados organismos fúngicos. A terapia tópica antifúngica tem sido considerada como a primeira linha de tratamento. (Sharma S. *et al.*, 2014)

Uma vez que o sucesso da aplicação tópica de fármacos na cavidade oral pode ser comprometido pela falta de cumprimento pelo doente, tem sido sugerido que os agentes antifúngicos também possam ser incorporados em condicionadores de tecidos. (Sharma S. *et al.*, 2014) Portanto, várias tentativas para incorporar agentes antifúngicos ou antissépticos em condicionadores de tecidos e resinas acrílicas prótese têm sido relatados, no sentido de evitar a formação de biofilmes dentários na superfície da prótese e a colonização destes mesmos condicionadores de tecidos. (Marra J., *et al.*, 2012; Urban VM, *et al.*, 2009; Sharma S., *et al.*, 2014)

A maioria dos condicionadores de tecido não apresenta qualquer atividade antifúngica, contudo diferentes estudos demonstraram o seu papel de apoio na adesão e crescimento de *Candida* conduzindo ao aparecimento de estomatite protética na cavidade oral de pacientes com próteses. (Waters MG. *et al.*, 1997; Klak Y. *et al.*, 1997)

Vários estudos tentaram incorporar agentes antifúngicos no condicionador de tecidos para a prevenção e o tratamento da estomatite protética. (Quinn DM. *et al.*, 1985; Akiba N. *et al.*, 2005; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010)

Um condicionador de tecidos com atividade antifúngica pode constituir grande vantagem para pacientes com um elevado risco estomatite protética. (Epinel-Ingroff A. *et al.*, 2005; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010)

Nistatina (NYS), foi o primeiro fármaco polieno a ser identificado, originalmente extraído a partir de *Streptomyces nousei*. Estruturalmente a Nistatina é semelhante à Anfotericina B, e actua por ligação a ergosterol, um componente da membrana celular dos fungos. A alteração na permeabilidade da membrana permite a libertação de potássio, açúcares e metabolitos, resultando em morte fúngica. Nistatina é ativa contra uma ampla variedade de fungos patogénicos, incluindo *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma* e *Coccidioides spp.* Este fármaco tem sido usado desde há várias décadas no tratamento de candidíases. O uso clínico, que não seja por aplicação tópica, foi limitado pelos efeitos secundários sistémicos e toxicidade, que se manifesta por tromboflebite, febre e arrepios, estes podem ser observados se for administrada IV. (J. Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999)

A incorporação de Nistatina em condicionadores de tecidos parece oferecer uma abordagem válida para evitar a candidíase. (Skupien JA *et al.*, 2003)

Nistatina é o fármaco mais utilizado no tratamento tópico padrão atual para a candidíase oral e Fluconazol é o antifúngico usado sistemicamente em alternativa à Nistatina tópica. (Bissel V. *et al.*, 1993; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010)

Ao longo dos anos tem sido estudada a eficácia de outros fármacos como solução oral, nomeadamente o Fluconazol. Muitos autores têm-se centrado sobre a avaliação da eficácia e segurança da solução oral do Fluconazol para o tratamento de candidíase orofaríngea, apresentando bons resultados, embora mais estudos ainda sejam necessários. (Garcia-Cuesta C. *et al.*, 2014; Goins RA. *et al.*, 2002; Epstein JB. *et al.*, 2002; Lefebvre JL. *et al.*, 2002; Sholapurkar AA. *et al.*, 2009; Taillandier J. *et al.*, 2000)

De acordo com autor Lefebvre JL *et al.*, 2002, a administração de Fluconazol em suspensão oral é eficaz e segura, segundo o seu estudo efetuado em pacientes com candidíase durante o tratamento do cancro com radioterapia e/ou quimioterapia. Este fármaco tem mostrado reduzir a incidência de candidíase quando administrado como profilaxia em casos de tratamento de cancro cabeça e pescoço. (Rao NG. *et al.*, 2012; Lefebvre JL. *et al.*, 2002)

Segundo a evidência científica importa estudar outros fármacos, como o Itraconazol, que são eficazes quando as espécies de *Candida* são resistentes ao Fluconazol. (Garcia-Cuesta C. *et al.*, 2014)

O Itraconazol é um agente antifúngico da classe dos azóis ativo contra uma larga gama de fungos clinicamente relevantes. Para a *Candida*, o Itraconazol é utilizado principalmente para o tratamento de infeções das mucosas. A absorção do fármaco é afetada pela formulação, pH gástrico e estado prandial. O Itraconazol exibe uma farmacocinética não-linear e é metabolizado pela hidroxil-itraconazol, que também tem atividade antifúngica. Estudos clínicos concluíram que o Itraconazol e Fluconazol são igualmente eficazes para o tratamento de candidíase. (M.C. Arendrup *et al.*, 2016; Pisouni E. *et al.*, 2008; Graybill JR. *et al.*, 1998; Wilcox Cm. *et al.*, 1997)

Importa frisar que tem sido demonstrado que a imersão das próteses numa solução de Clorhexidina inibe a adesão de *C. albicans* à prótese (Pusateri CR. *et al.*, 2009; Cao Z. *et al.*, 2010) devido ao seu efeito antimicrobiano de largo espectro, sendo também amplamente prescrito como antisséptico oral e nos procedimentos de higiene da prótese (Brozek R. *et al.*, 2011; Vanden AA. *et al.*, 2008; Bertolini MM. *et al.*, 2014)

Desta forma, a Clorhexidina tem sido descrita como um agente de terapia coadjuvante, devido à sua atividade antimicrobiana contra um largo espectro de microrganismos, em que a *Candida* está incluída. (Urban VM, *et al.*, 2009)

A evidência científica apoia e reconhece a Clorhexidina (CHX) como o *goldstandard* em relação aos outros agentes anti-placa e no tratamento da gengivite. (Jones CG 1997) A CHX é um agente biocida catiónico sintético e pertence ao grupo das biguanidas (Figueiral MH. *et al.*, 1997), sendo descrita pela primeira vez na década de 40 pela *Imperial Chemical Industries*, Inglaterra. (Lindhe J. *et al.*, 2003) Mais tarde, Davis *et al.* (Davies GE *et al.*, 1954), em 1954, concluiu que o agente com as características bacteriostáticas e bactericidas mais eficazes seria o 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane - um detergente catiónico sintético geralmente referido como "Clorhexidina". (Ronanki S. *et al.*, 2016)

A inibição da placa bacteriana pela CHX foi primeiramente investigada por Schroeder (Schroeder HE *et al.*, 1969), em 1969, mas o estudo definitivo foi realizado por Loe e Schiøtt (Loe H *et al.*, 1970) em 1970. Os estudos *in vitro* demonstraram que, em baixas concentrações, a CHX provoca danos na membrana celular, e as moléculas de baixo peso molecular escapam aos microrganismos. Em concentrações mais elevadas, a CHX provoca a precipitação e a coagulação das proteínas no citoplasma dos microrganismos que fiquem expostos à sua ação. (Hugo WB *et al.*, 1966) Estas propriedades interferem com a formação de biofilme e evitam os processos de crescimento. (Denton GW *et al.*, 1991; Ronanki S. *et al.*, 2016) Desta forma, a CHX, em solução, tem carga positiva, pelo que é atraída e se une a estruturas aniónicas (de carga negativa) como são o caso das glicoproteínas salivares e da superfície das células bacterianas. Pelo seu mecanismo de ação, a CHX é bactericida para as bactérias gram+, gram- e fungos, e é a inespecificidade total deste mecanismo que torna muito difícil o desenvolvimento de resistências. (Figueiral MH. *et al.*, 1997)

A eficácia a longo prazo e a segurança do bochecho com CHX foram comprovados em vários estudos. (Van Strydonck DA *et al.*, 2005; Segreto VA *et al.*, 1986; Loe H *et al.*, 1976) Independentemente das potentes propriedades antimicrobianas e anti-placa da CHX, as suas aplicações generalizadas são limitadas pelos efeitos colaterais locais, que na maior parte dos casos são dependentes da dose. (Mackenzie IC *et al.*, 1976) Embora a CHX seja um agente eficaz em diferentes concentrações (0,2%, 0,12% e 0,1%), administração destes agentes antimicrobianos requer uma avaliação cuidadosa para a situação clínica e uma análise precisa. (Ronanki S. *et al.*, 2016)

As principais vantagens de adicionar agentes antifúngicos aos condicionadores de tecidos resumem-se a: o custo reduzido para o paciente, considerando que só uma fração do agente antifúngico é usado quando comparado com a terapia convencional; a ausência de cooperação do paciente; o tratamento simultâneo de tecidos suporte de prótese dentária já com lesão e da infeção por espécies de *Candida*; e a redução da frequência de aplicação. Além disso, as terapias convencionais são difíceis para colocar em prática nos cuidados institucionalizados e paliativos, sobretudo quando os pacientes têm perda de

memória, assim como o controlo cognitivo reduzido e destreza motora, o que pode levar os pacientes a depender de cuidadores para seguir as instruções de administração de medicamentos. (Urban VM, *et al.*, 2009)

Contudo, esta premissa ainda não está perfeitamente clarificada e restam dúvidas que se tornam fundamentais esclarecer.

1.5. OBJETIVOS E JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Dada a existência de alguma dúvida de informação na literatura sobre a durabilidade do efeito antimicrobiano da incorporação de fármacos nos condicionadores de tecidos, pretende-se com esta investigação tentar contribuir para a compreensão do efeito terapêutico do fármaco ao longo do tempo no condicionador de tecidos.

Desta forma, constitui o principal objetivo deste estudo avaliar a atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos disponível no mercado, combinado com fármacos antifúngicos para inibir a colonização por espécies de *Candida*.

Para alcançarmos uma compreensão da atividade antimicrobiana e da eficácia da incorporação de fármacos, é necessário analisar o efeito desta terapêutica, aplicada nos condicionadores de tecidos, ao longo do tempo.

Apresentam-se desta forma duas questões de investigação, as quais se pretenderá dar resposta com este estudo:

- 1 – A incorporação de antifúngicos em condicionador de tecidos possui efeito fungicida?
- 2 – Qual a durabilidade do efeito antifúngico do condicionador de tecidos modificado?

2.MATERIAL E MÉTODOS

“Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos
modificado”

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo decorreu no período de novembro de 2015 a abril de 2016 no âmbito do Mestrado de Reabilitação Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, tendo sido realizado em colaboração com Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, a qual possuía requisitos imprescindíveis para o fornecimento dos matérias e ensaios a serem realizados.

2.1. ESCOLHA DA AMOSTRA E MATERIAL

A amostra desta investigação foi composta por 108 cilindros de 6mmX5mm de condicionador de tecidos, Ufi Gel SC da VOCO[®] automistura (Figura 4). A dimensão dos cilindros foi a determinada para garantir a mistura em conformidade com as indicações do fabricante (Tabela 1) e tendo por base literatura científica específica e adequada ao estudo (Sharma *et al.*, 2013)



Figura 4 - Condicionador de Tecidos Ufi Gel SC da VOCO GmbH[®] (Germany). Fonte: com autorização do autor.



Figura 5 - A - Mycostatin[®] Nistatina 100.000 U.I./ml; B - Diflucan[®] Fluconazol 2mg/ml; C - Sporanox[®] Itraconazol 10mg/ml Solução Oral; D - Parodontax[®] 0,2% Clorhexidina. Fonte: com autorização do autor.

As concentrações mínimas inibitórias (MIC) dos fármacos (Figura 5) Nistatina a 5%, Fluconazol a 5%, Itraconazol a 5%, e Clorhexidina a 0,2%, para biofilme foram utilizadas de acordo com as presentes nos estudos científicos até à data da realização desta investigação. (El Charkawi 1994; Chow 1999; Sharma *et al.*, 2014; Marra *et al.*, 2012; Srivatstava A. *et al.*, 2013)

Composição, Fabrico e Número de lote dos materiais (Condicionador de tecidos, Clorhexidina, Fluconazol, Nistatina e Itraconazol)		
Composição do Material	Fabricante	Número do Lote
Mistura de diferentes polialquilsiloxanos , sílica fumada , catalisadores , aditivos e butanona	UFI Gel SC ® VOCO GmbH ^a	1605059
A substância ativa é o Gluconato de Clorhexidina. - Os outros componentes são: Óleo de rícino hidrogenado polioxilo 40, glicerol, sorbitol líquido (não cristalizável), aroma de hortelã- pimenta e água purificada.	Paradontax ® GlaxoSmithKline UK Consumer Healthcare ^a	5280440
50 mg de fluconazol. Cada ml contém 9 mg de cloreto de sódio (equivalente a 0,154 mmol de sódio). Água para preparações injetáveis Hidróxido de sódio (para ajuste de pH)	Diflucan ®Laboratórios Pfizer, Lda. ^b	8741702
A substância activa é o itraconazol (10 mg de itraconazol por ml). Os outros componentes são hidroxipropil-β-ciclodextrina, sorbitol, propilenoglicol, ácido clorídrico, aroma de cereja, aroma de caramelo, sacarina sódica, hidróxido de sódio e água.	Sporanox ® Janssen Farmacêutica Portugal, Lda. ^b	978848
A substância ativa é nistatina. Os outros componentes são sacarose, glicerina, carmelose, fosfato de sódio dibásico, para-hidroxibenzoato de metilo (E218), para-hidroxibenzoato de propilo (E216), etanol, aroma de cereja, óleo essencial de hortelã-pimenta, aldeído cinâmico, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e água purificada	Mycostatin ®Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa, SA ^b	08101600

^a Material safety data sheet information.

^b Infarmed

Tabela 1 - Composição, Fabrico e Número de lote dos materiais (condicionador de tecidos, Clorhexidina, Fluconazol, Nistatina e Itraconazol) usados no estudo.

A determinação do meio de cultura *sabouraud* dextrose agar e do fungo *C. albicans* SC5314 (estirpe de referência) (Figura 6) a ser inoculado também foi baseada na literatura científica. (Sharma *et al.*, 2013; Radnai M. *et al.*, 2010; Ki-Young N. *et al.*, 2009)



Figura 6 – *C. albicans* SC5314

2.2. PREPARAÇÃO DO INÓCULO, CILINDROS DE CONDICIONADOR **TECIDOS E APLICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS**

A preparação dos cilindros de condicionador de tecidos, a inoculação de *C. albicans* SC5314 e aplicação dos antimicrobianos foi efetuada na íntegra no Laboratório de Investigação em Biofilmes Rosário Oliveira do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, sob orientação da Prof.^a Doutora Mariana Henriques.

A preparação das amostras de condicionador de tecidos e a inoculação foi realizada de acordo com o protocolo que se descreve de seguida.

2.2.1. Preparação do Inoculo

Primeiramente, efetuou-se um pré-inóculo de *C. albicans* SC5314 em erlenmeyer, com 40 mL de *sabouraud* dextrose broth (SDB) e incubou-se a 37°C a 120 rpm, durante 16h. Seguidamente, realizou-se um inóculo a 5 McFarland (Sharma *et al.*, 2013) e incorporou-se o inóculo em *sabouraud* dextrose

agar (SDA), deixando-se solidificar. A preparação foi efetuada numa câmara de fluxo laminar de classe 2, permitindo o cumprimento das normas de segurança (Figura 7).

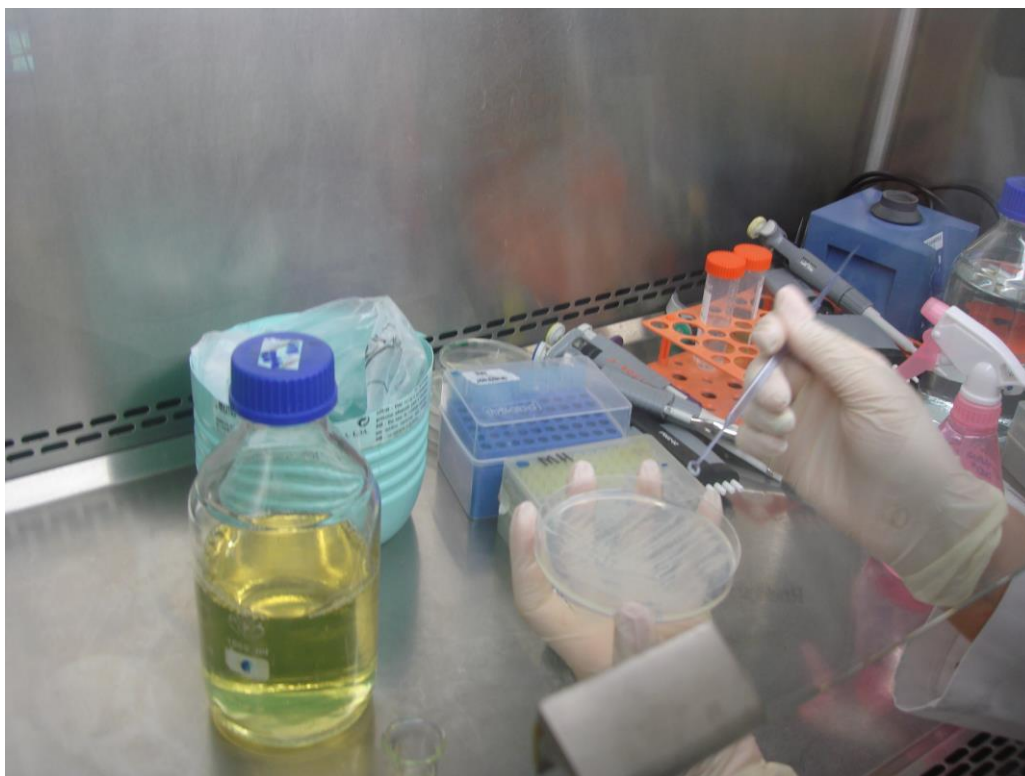


Figura 7 - Preparação pré-inóculo de *C. albicans* SC5314.

Usando um sistema de biopsia por aspiração (bisturi circular estéril) foram criadas perfurações no meio de cultura SDA para todas as concentrações dos materiais a testar (Figura 8).

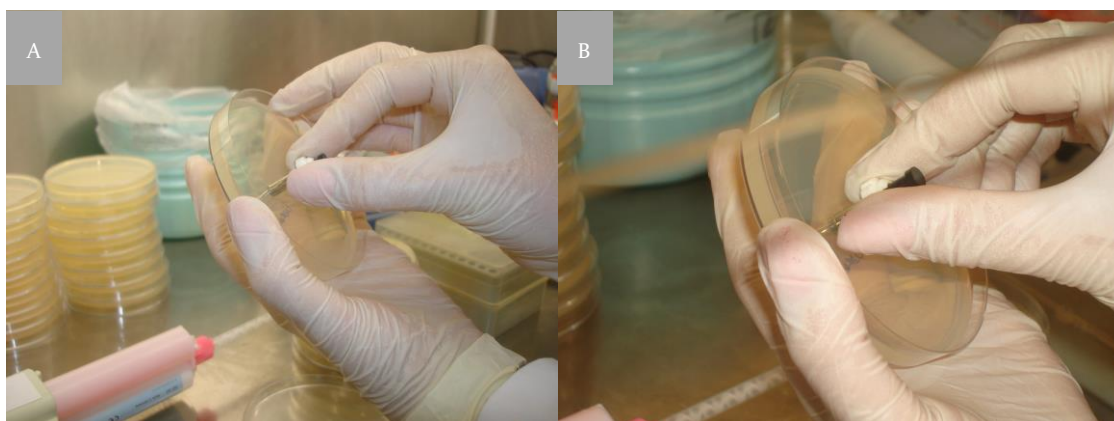


Figura 8 - A - Execução das perfurações usando a biopsia por aspiração. B - Pormenor da perfuração.

2.2.2. Preparação dos Cilindros de Condicionador de Tecidos

Preparou-se o condicionador de tecidos em sistema de automistura numa caixa de petri de vidro e deixou-se solidificar durante 2 a 5 minutos, conforme indicações do fabricante para uso em laboratório. De seguida procedeu-se à realização de pequenos cilindros no condicionador de tecidos, utilizando o sistema de biopsia por aspiração com bisturi circular estéril (Figura 9).

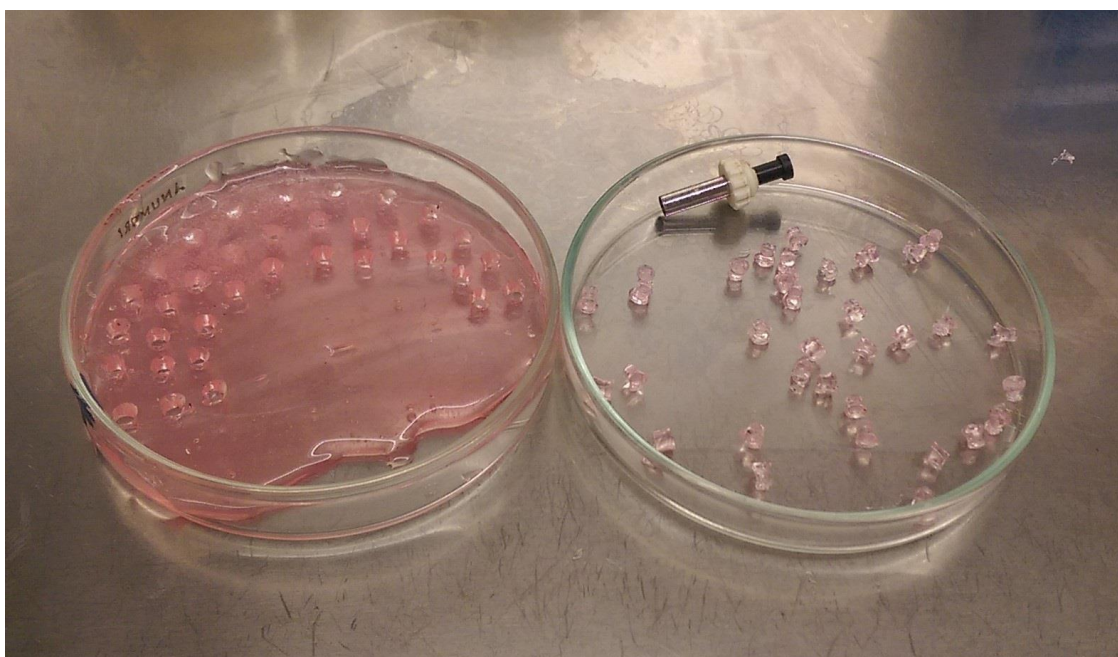


Figura 9 - Cilindros de condicionador de tecidos Ufi Gel SC.

2.2.3. Aplicação dos Antimicrobianos

Numa placa de 24 poços, colocaram-se os cilindros em contacto com os agentes antifúngicos (Figura 10) Fluconazol, Itraconazol, Nistatina e Clorhexidina nas concentrações já descritas em literatura (El Charkawi 1994; Chow 1999; Sharma et al., 2014; Marra et al., 2012; Srivatstava A. et al., 2013), durante 30 segundos e durante 1 minuto, a 120 rpm, para que se efetuasse o processo de incorporação dos fármacos (Figura 11).

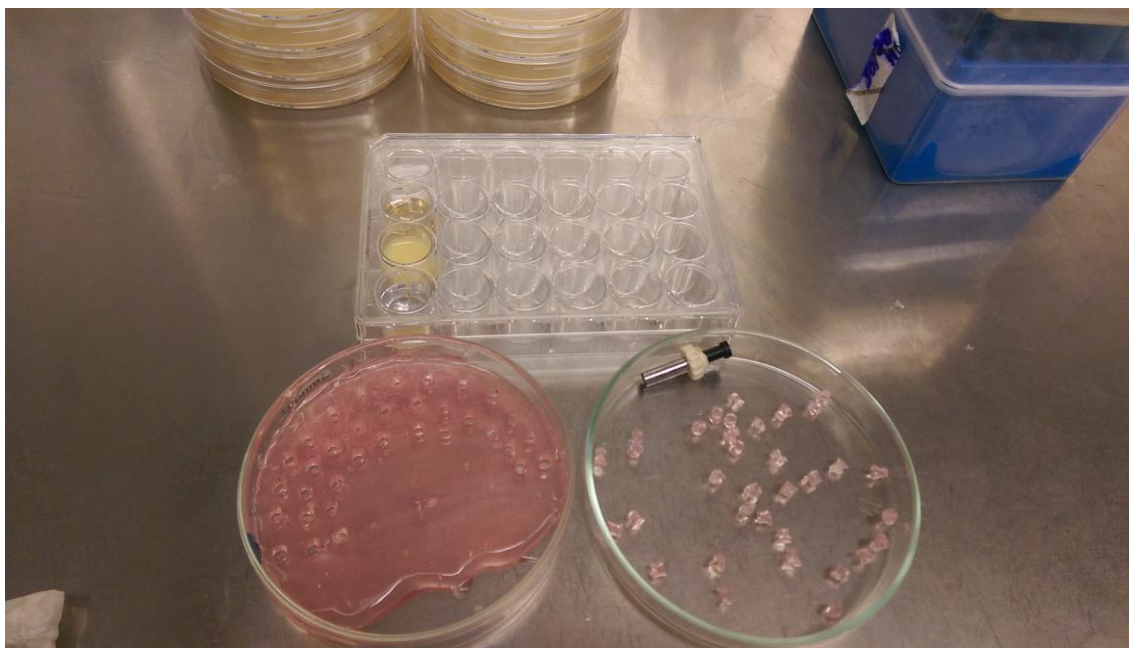


Figura 10 - Colocação dos cilindros de condicionador nos poços com os agentes antifúngicos.



Figura 11 - Processo de agitação para incorporação dos agentes antifúngicos.

Após o processo de incorporação dos agentes antifúngicos, colocaram-se os cilindros nas perfurações do meio de cultura SDA (Figura 12), inoculado previamente com biofilme a 37°C e mediram-se os halos de inibição durante os 7 dias consecutivos (de 24 em 24 h), para cada fármaco. As placas foram conservadas durante os 7 dias numa estufa a 37°C e revestidas a Parafilm® para conservar a humidade do meio cultura (Figura 13).

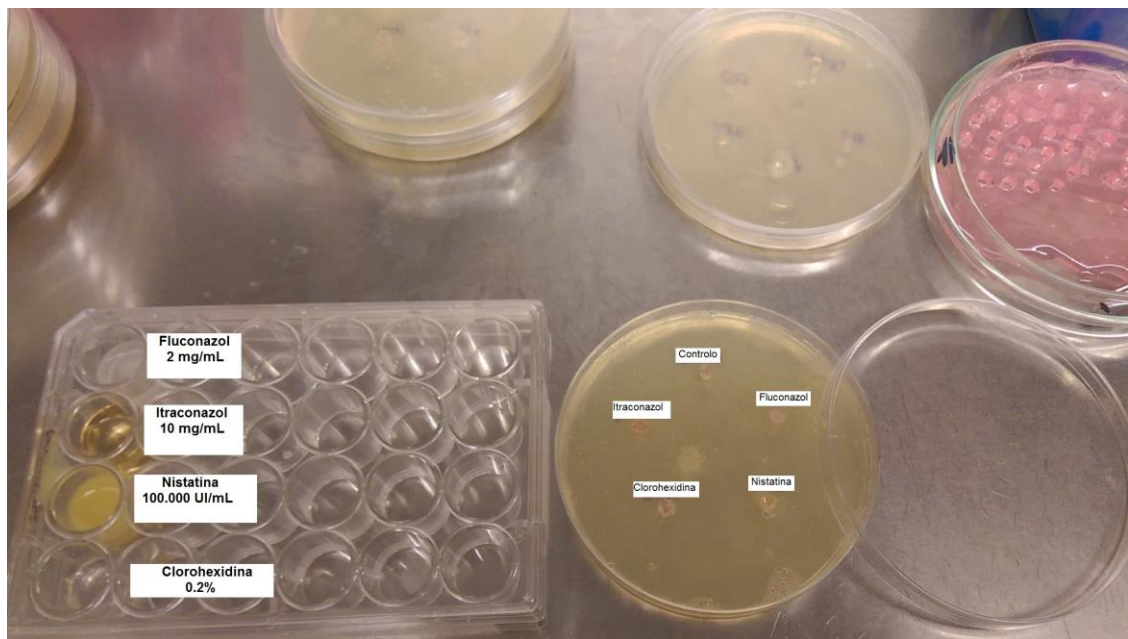


Figura 12 - Colocação dos cilindros de condicionador de tecidos modificado no meio cultura SDA.



Figura 13 - Colocação das placas na estufa a 37°C.

2.3. ANÁLISE DO EFEITO DOS ANTIMICROBIANOS

A avaliação dos efeitos da modificação do condicionador de tecidos foi realizada pelo teste do Halo de inibição (Figura 14) descrito em 1966 por Bauer e Kirby. (Bauer AW *et al.*, 1966) As placas foram incubadas a 37°C durante 7 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicado em duas condições de incorporação 30s e 1 min. durante 3 semanas diferentes. A distribuição dos cilindros de condicionador de tecidos para análise do efeito antifúngico encontra-se esquematizada na Figura 15.

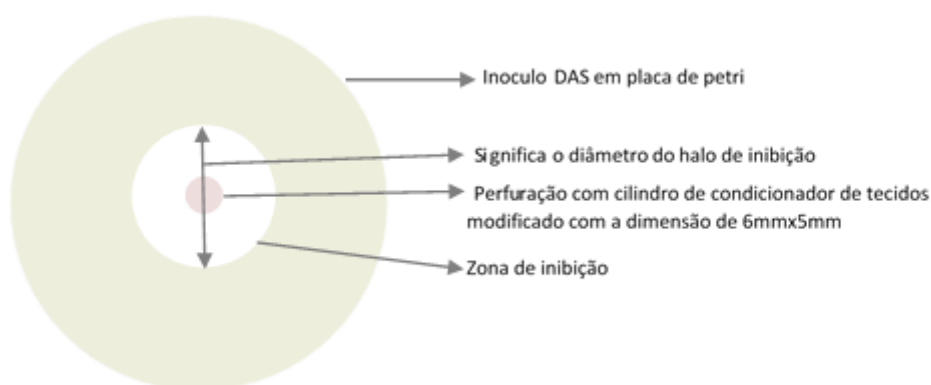


Figura 14 – Representação esquemática de inoculação em placas de petri com UFI Gel SC modificado com agentes antifúngicos. Fonte: Adaptado de Sharma *et al.*, 2014 (Sem autorização do autor).

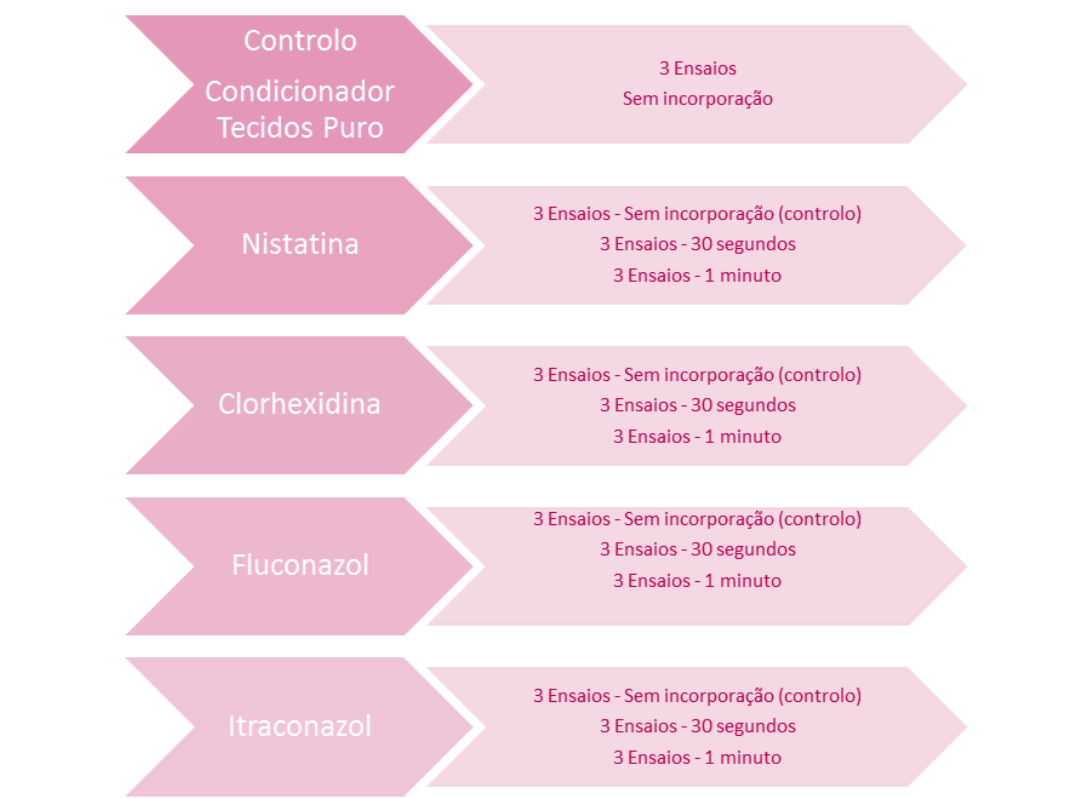


Figura 15 - Esquemática da distribuição dos cilindros de condicionador de tecidos para a incorporação dos antimicrobianos. Todos os ensaios foram repetidos em triplicado durante 3 semanas diferentes.

2.4. TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi efetuada com recurso ao IBM® SPSS® Statistics (Versão 23 do SPSS®).

Atendendo à natureza das variáveis envolvidas a análise consistiu:

- no estudo descritivo dos dados para as variáveis qualitativas e quantitativas foram realizados gráficos de perfil e tabelas de estatísticas sumárias;
- no estudo comparativo ao longo do tempo foram realizados testes ANOVA com medidas repetidas com k níveis de avaliação (k tempos diferentes);
- na avaliação da distribuição dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para testar o ajuste da normalidade dos dados (para as variáveis contínuas).

A regra de decisão utilizada consistiu em detetar evidência estatística significativa para valores de probabilidade (valor prova do teste) inferiores a 0,05.

3.RESULTADOS

“Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos
modificado”

RESULTADOS

Para avaliação do efeito antimicrobiano do condicionador de tecidos em SDA inoculado com *C. albicans* foram utilizados 108 cilindros de condicionador de tecidos, segundo o protocolo descrito no capítulo Materiais e Métodos.

Após o período de incubação dos cilindros de condicionador de tecidos, durante 7 dias a 37°C, obtiveram-se os resultados em milímetros do diâmetro do halo de inibição para o grupo do controlo dos fármacos (Figura 16), condicionador com incorporação de 30 s (Figura 17) e incorporação de 1 min. (Figura 18). A análise sumária encontra-se presente na Tabela 2.

Descritivas para variável dependente (halos) segundo o antimicrobiano e o tempo de incorporação

		Antimicrobianos											
		FLU			ITRA			NYS			CHX		
		sem	30"	1 min	sem	30"	1 min	sem	30"	1 min	sem	30"	1 min
Halos 24H	Valid N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	Mean	27,44	22,33	25,22	21,89	21,89	22,67	14,89	13,67	14,56	9,89	12,56	12,89
	Standard Deviation	2,07	1,12	2,68	3,02	2,62	3,12	2,09	,87	1,13	1,17	1,42	1,17
Halos 48H	Valid N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	Mean	29,78	24,00	25,67	24,22	23,00	25,33	13,22	14,22	14,44	8,33	13,11	13,11
	Standard Deviation	1,86	2,00	2,50	,67	2,12	2,00	1,09	,83	1,01	,87	1,76	1,45
Halos 3dias	Valid N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Mean	30,33	23,33	25,00	26,00	24,17	25,17	13,67	14,00	14,67	7,83	12,00	13,00
	Standard Deviation	1,75	1,97	1,26	1,67	2,23	,41	2,07	,63	,82	1,17	,63	1,79
Halos 4dias	Valid N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Mean	31,00	24,67	26,00	25,33	24,00	25,67	14,00	14,67	14,67	7,00	12,33	12,33
	Standard Deviation	1,73	2,31	1,73	,58	1,73	,58	1,73	,58	,58	1,00	,58	,58
Halos 5dias	Valid N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Mean	34,00	24,67	27,33	27,33	26,67	27,67	12,00	16,67	15,00	7,33	14,33	14,67
	Standard Deviation	1,00	,58	,58	,58	2,52	,58	1,73	,58	1,00	,58	,58	1,53
Halos 6dias	Valid N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Mean	31,83	24,33	27,50	26,33	25,17	25,17	11,67	15,50	15,67	7,17	14,50	14,67
	Standard Deviation	2,48	1,97	1,87	1,63	2,40	,98	1,37	2,17	1,03	1,17	1,52	1,51
Halos 7dias	Valid N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	Mean	31,00	25,33	27,67	25,89	25,33	25,44	12,00	15,56	15,67	7,11	14,33	14,78
	Standard Deviation	1,50	1,94	1,80	1,69	1,87	1,42	2,00	1,59	1,12	1,05	1,73	1,39

Tabela 2

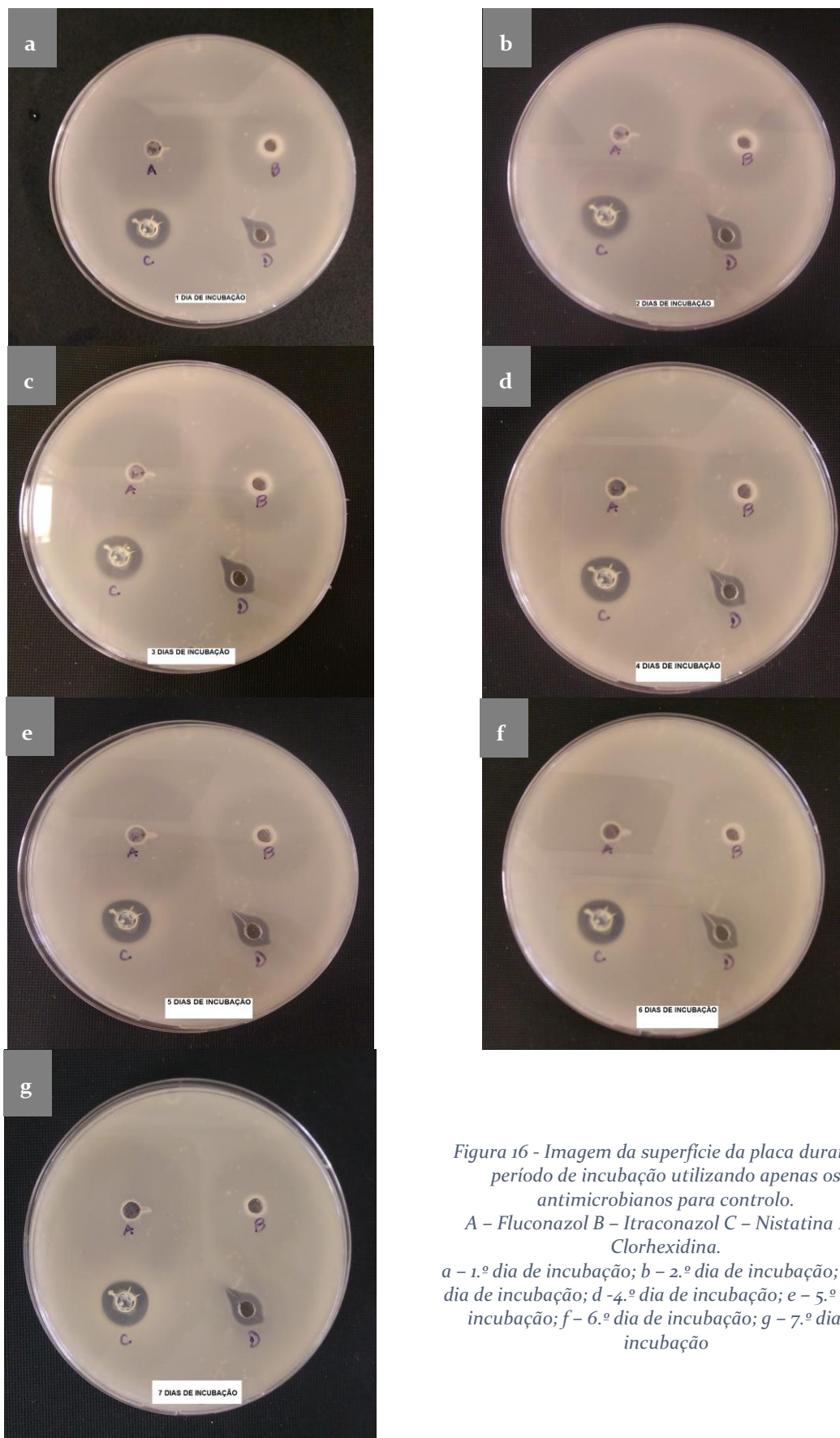


Figura 16 - Imagem da superfície da placa durante o período de incubação utilizando apenas os antimicrobianos para controlo.

A - Fluconazol B - Itraconazol C - Nistatina D - Clorhexidina.

a - 1.º dia de incubação; b - 2.º dia de incubação; c - 3.º dia de incubação; d - 4.º dia de incubação; e - 5.º dia de incubação; f - 6.º dia de incubação; g - 7.º dia de incubação

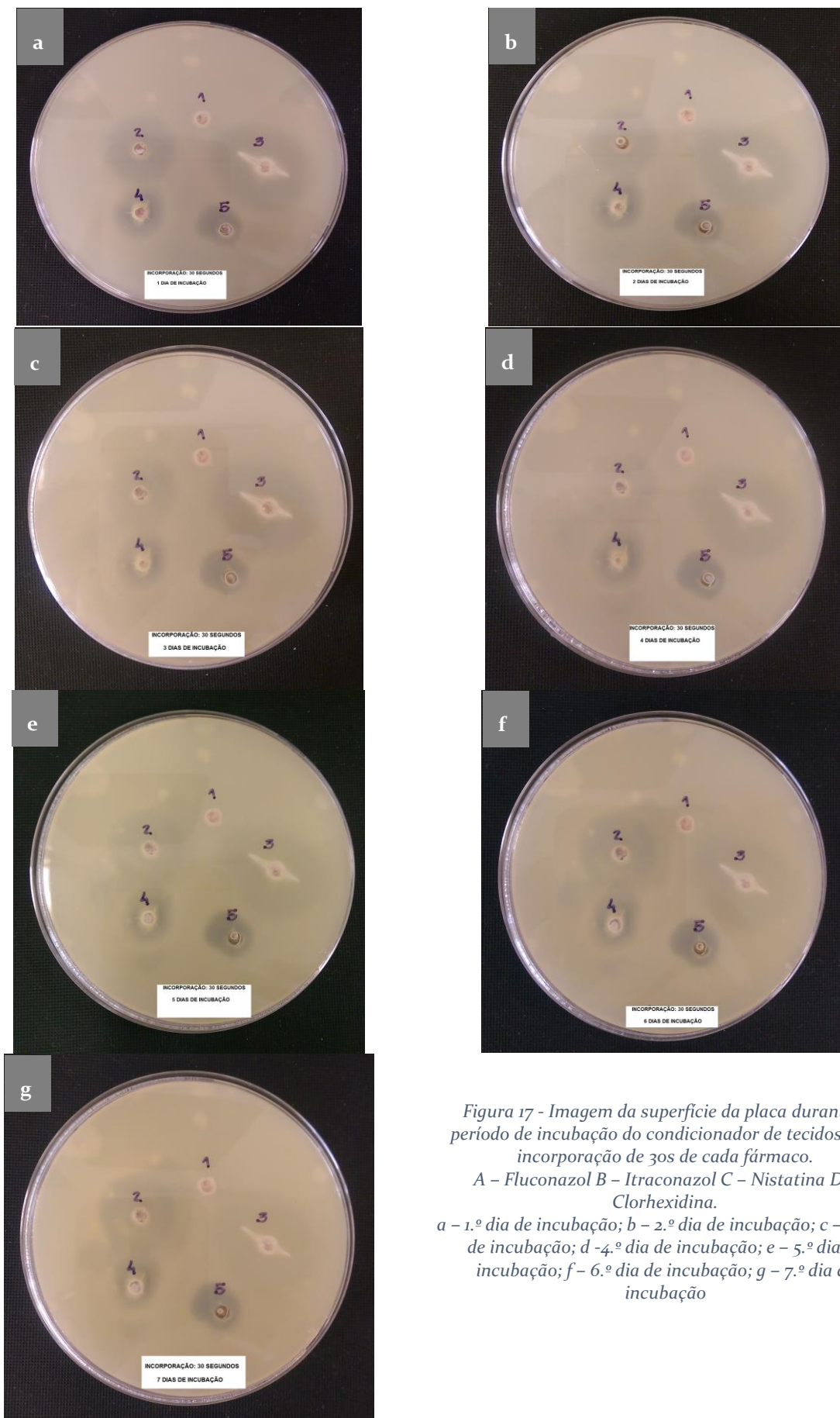


Figura 17 - Imagem da superfície da placa durante o período de incubação do condicionador de tecidos com incorporação de 30s de cada fármaco.

A - Fluconazol B - Itraconazol C - Nistatina D - Clorhexidina.

a - 1.º dia de incubação; b - 2.º dia de incubação; c - 3.º dia de incubação; d - 4.º dia de incubação; e - 5.º dia de incubação; f - 6.º dia de incubação; g - 7.º dia de incubação

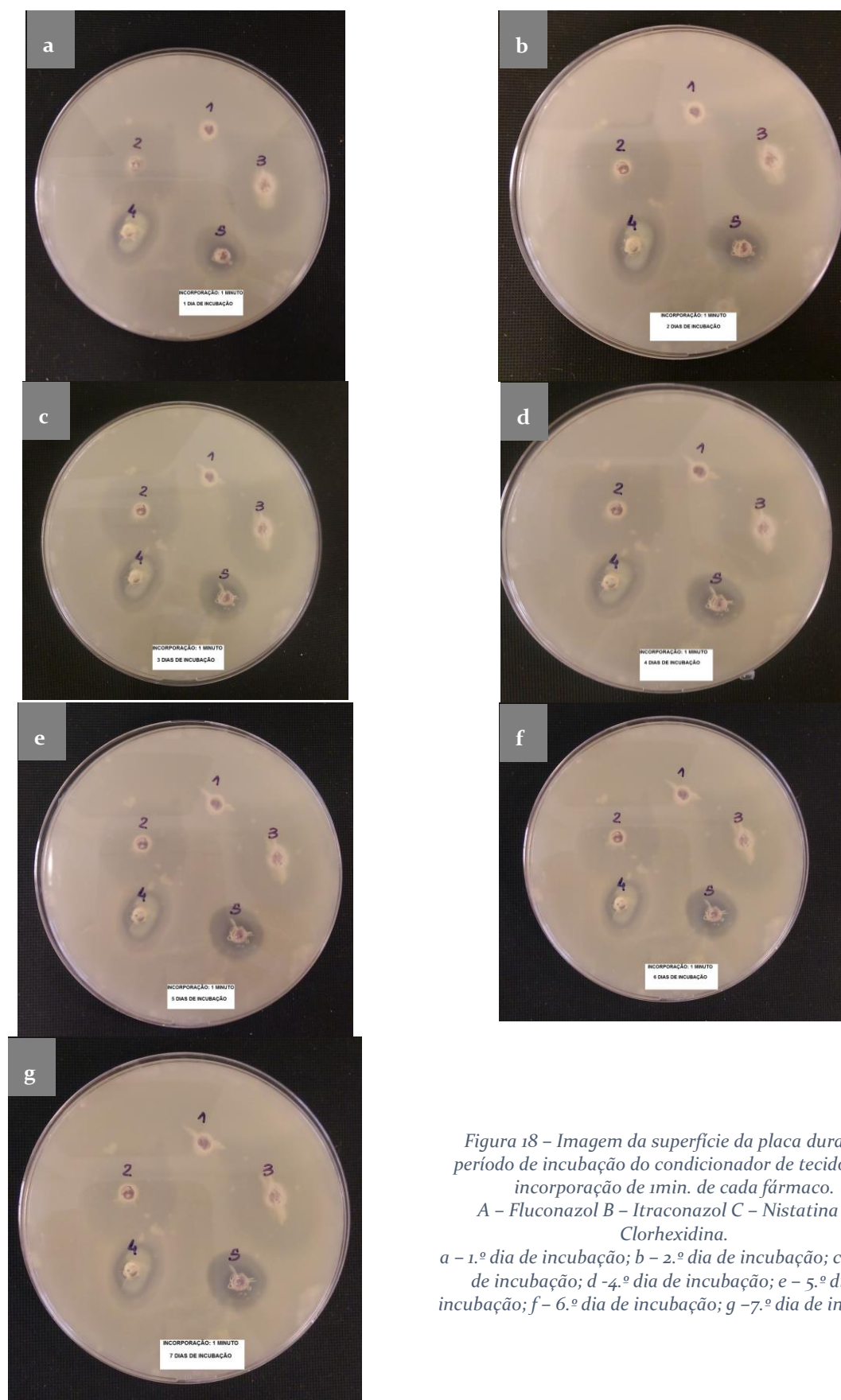


Figura 18 – Imagem da superfície da placa durante o período de incubação do condicionador de tecidos com incorporação de 1min. de cada fármaco.

A – Fluconazol B – Itraconazol C – Nistatina D – Clorhexidina.

a – 1.º dia de incubação; b – 2.º dia de incubação; c – 3.º dia de incubação; d – 4.º dia de incubação; e – 5.º dia de incubação; f – 6.º dia de incubação; g – 7.º dia de incubação

Para avaliação da influência dos fatores (tempo de incorporação e fármaco) no valor médio dos halos, consideraram-se as medições às 24h, 48h e 7 dias que tiveram o mesmo número de observações. Para tal, utilizou-se o procedimento ANOVA com medidas repetidas.

Desta forma, foi verificado o pressuposto da Normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov, cujo valor $p > 0,05$ para todos os tempos de avaliação segundo o fármaco e incorporação. Assim não existem argumentos para rejeitar a Normalidade para esta variável.

Testado o pressuposto da esfericidade através do teste de Mauchly (valor $p < 0,05$), rejeita-se a esfericidade dos dados. Como o valor da estimativa de ϵ é superior a 0,75, utilizou-se a correção de Huynh-Feldt para interpretação dos resultados nos efeitos intra-sujeitos.

Testes de efeitos intra-sujeitos (para halos).						
Fonte		Type III Sum of Squares	Gl	Média	F	Sig.
factor1	Sphericity Assumed	154,562	2	77,281	36,021	,000
	Greenhouse-Geisser	154,562	1,729	89,396	36,021	,000
	Huynh-Feldt	154,562	1,960	78,877	36,021	,000
	Lower-bound	154,562	1,000	154,562	36,021	,000
factor1 * Fármaco	Sphericity Assumed	133,142	6	22,190	10,343	,000
	Greenhouse-Geisser	133,142	5,187	25,669	10,343	,000
	Huynh-Feldt	133,142	5,879	22,649	10,343	,000
	Lower-bound	133,142	3,000	44,381	10,343	,000
factor1 * Incorporação	Sphericity Assumed	44,123	4	11,031	5,142	,001
	Greenhouse-Geisser	44,123	3,458	12,760	5,142	,001
	Huynh-Feldt	44,123	3,919	11,259	5,142	,001
	Lower-bound	44,123	2,000	22,062	5,142	,008
factor1 * Fármaco * Incorporação	Sphericity Assumed	102,914	12	8,576	3,997	,000
	Greenhouse-Geisser	102,914	10,374	9,921	3,997	,000
	Huynh-Feldt	102,914	11,757	8,753	3,997	,000
	Lower-bound	102,914	6,000	17,152	3,997	,001

Tabela 3 - Testes de efeitos intra-sujeitos (para halos). Gl – graus de liberdade, F- frequência, Sig- significância do valor.

Dos resultados assinalados na Tabela 3, verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas nos valores médios dos halos nos diferentes períodos considerados, isto é, existe variação significativa no valor médio dos halos ao longo do tempo, no sentido de que este aumenta significativamente ao longo do tempo.

De igual modo, existem diferenças significativas no valor médio dos halos devido à interação do tempo e fármaco ($F(5,879; 188,115) = 10,343$, valor $p < 0,05$), isto significa que as médias dos halos nos grupos

de fármacos não variam de forma idêntica nos tempos considerados. Este facto reflete-se nas linhas não paralelas no gráfico da Figura 19. (Crowder MJ et al., 1990; Diggle PJ 1988; Field A. 2000)

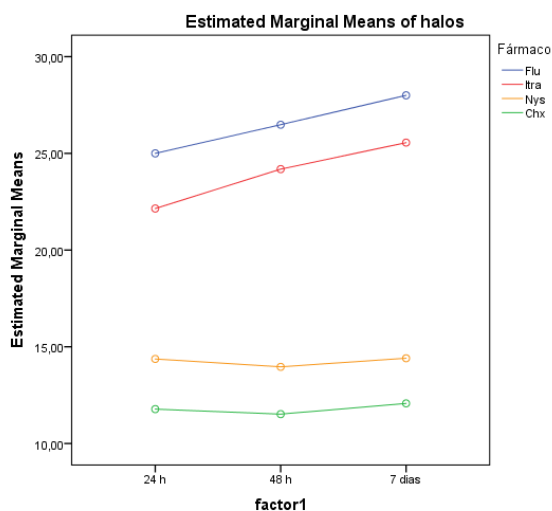


Figura 19 – Gráfico de perfil para o valor médio dos halos ao longo dos 3 períodos para cada fármaco.

De facto, existem diferenças significativas no valor médio dos halos devido à interação do tempo e incorporação ($F(3,919; 188,115)=5,142$, valor $p < 0,05$), isto significa que as médias dos halos nos grupos de incorporação considerados variam de forma diferenciada nos tempos considerados. Este facto reflete-se nas linhas não paralelas no gráfico da Figura 20.

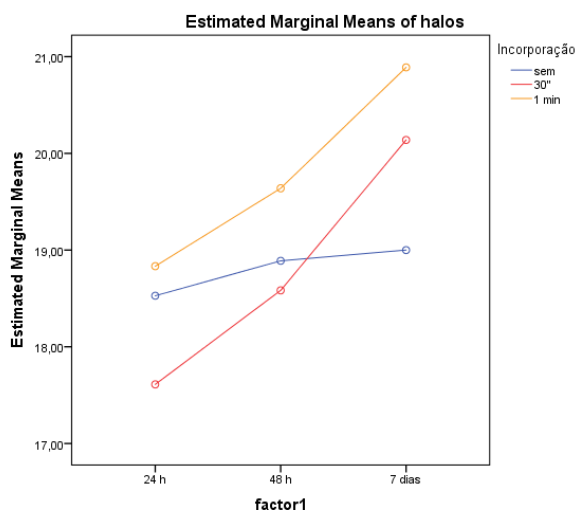


Figura 20 – Gráfico de perfil para o valor médio dos halos ao longo dos 3 períodos para cada incorporação.

Podemos observar que existem diferenças significativas no valor médio dos halos devido à interação do tempo com o fármaco e incorporação ($F(11,757; 188,115)=3,997$, valor $p < 0,05$), isto significa que as médias dos halos nas combinações de fármaco e incorporação considerados não variam de forma

idêntica nos tempos considerados. Este facto reflete-se nas linhas não paralelas nos gráficos da Figura 21.

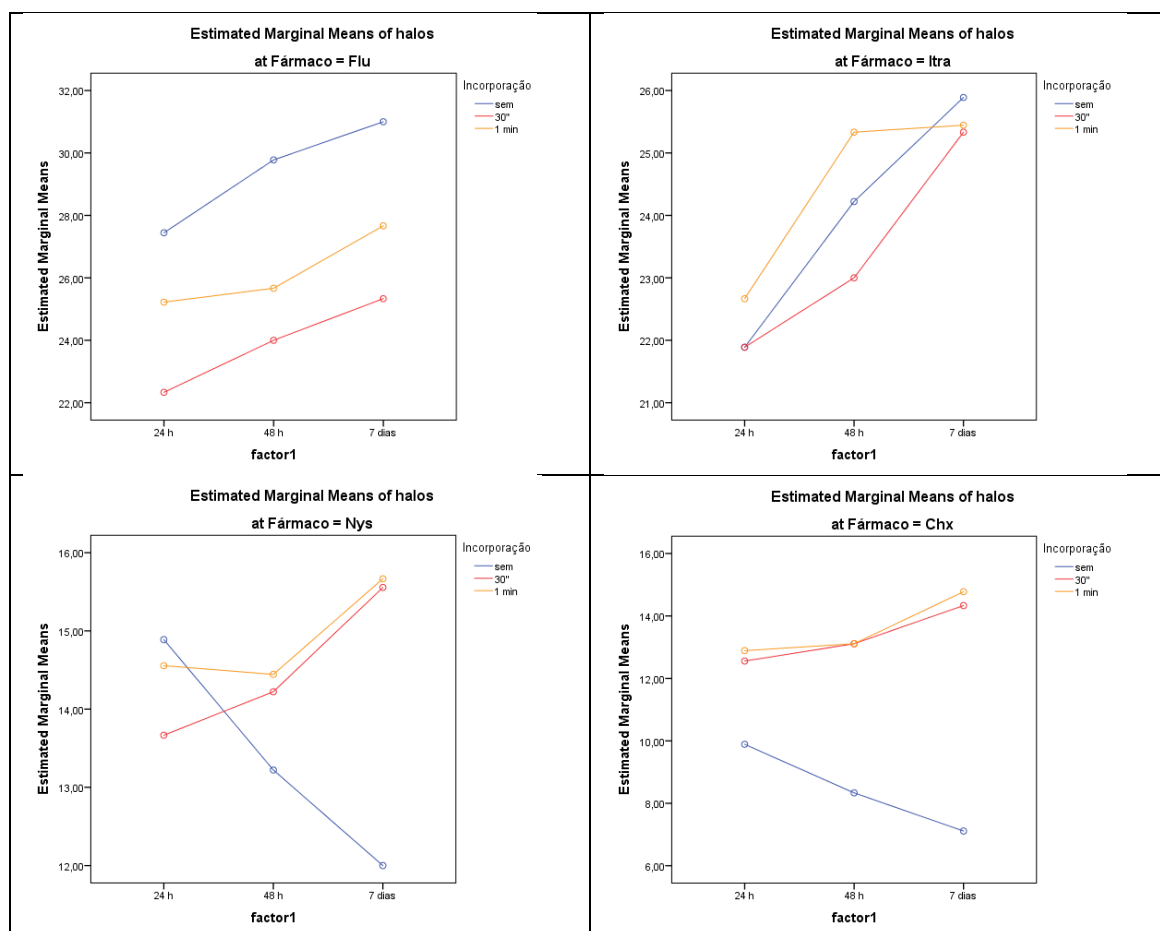


Figura 21 – Gráfico de perfil para o valor médio dos halos ao longo dos 3 períodos para cada combinação fármaco e incorporação.

De acordo com os resultados da Tabela 4 verifica-se que existem diferenças significativas no valor médio dos halos devido ao fármaco ($F_{(3, 96)}=823,631$, valor $p < 0,05$), devido à incorporação ($F_{(2, 96)}=7,010$, valor $p < 0,05$) e também devido à interação fármaco versus incorporação em cada tempo considerado ($F_{(6, 96)}=27,723$, valor $p < 0,05$).

Measure: halos

Transformed Variable: Average

Teste aos efeitos dos fatores							
Fonte	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
Intercept	118488,938	1	118488,938	23273,972	,000	23273,972	1,000
Fármaco	12579,432	3	4193,144	823,631	,000	2470,892	1,000
Incorporação	71,377	2	35,688	7,010	,001	14,020	,920
Fármaco * Incorporação	846,846	6	141,141	27,723	,000	166,340	1,000
Error	488,741	96	5,091				

a. Computed using alpha = ,05

Tabela 4 – Teste aos efeitos dos fatores. *Gl* – graus de liberdade, *F*- frequência, *Sig*- significância do valor.

Utilizando o teste de Bonferroni que propicia uma tabela de múltiplas comparações (tabela 5 e 6) com os respectivos valores de p ajustados face ao número de comparações realizadas, respeitando a significância inicial de 5%.

Comparações Múltiplas

Measure: halos

Bonferroni

(I) Fármaco	(J) Fármaco	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Flu	Itra	2,5309*	,35455	,000	1,5757	3,4860
	Nys	12,2469*	,35455	,000	11,2917	13,2021
	Chx	14,7037*	,35455	,000	13,7485	15,6589
Itra	Flu	-2,5309*	,35455	,000	-3,4860	-1,5757
	Nys	9,7160*	,35455	,000	8,7609	10,6712
	Chx	12,1728*	,35455	,000	11,2177	13,1280
Nys	Flu	-12,2469*	,35455	,000	-13,2021	-11,2917
	Itra	-9,7160*	,35455	,000	-10,6712	-8,7609
	Chx	2,4568*	,35455	,000	1,5016	3,4120
Chx	Flu	-14,7037*	,35455	,000	-15,6589	-13,7485
	Itra	-12,1728*	,35455	,000	-13,1280	-11,2177
	Nys	-2,4568*	,35455	,000	-3,4120	-1,5016

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,697.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Tabela 5 – Comparações múltiplas entre os antifúngicos usados aplicando o teste de Bonferroni.

Comparações Múltiplas

Measure: halos

Bonferroni

(I) Incorporação	(J) Incorporação	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
sem	30"	,0278	,30705	1,000	-,7204	,7759
	1 min	-,9815*	,30705	,006	-1,7297	-,2333
30"	sem	-,0278	,30705	1,000	-,7759	,7204
	1 min	-1,0093*	,30705	,004	-1,7574	-,2611
1 min	sem	,9815*	,30705	,006	,2333	1,7297
	30"	1,0093*	,30705	,004	,2611	1,7574

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,697.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Tabela 6 - Comparações múltiplas entre os tempos de incorporação dos antifúngicos aplicando o teste de Bonferroni.

4.DISSCUSSÃO

“Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos
modificado”

DISCUSSÃO

A ideia de incorporar agentes antifúngicos em condicionadores de tecidos foi introduzida há cerca de 40 anos atrás por Douglas e Walker. (Douglas WH. *et al.*, 1973) Desde então, diversos estudos têm sido realizados no sentido de se tentar melhorar a eficácia de condicionadores de tecidos, utilizando-se uma variedade de agentes antifúngicos. (Douglas WH. *et al.*, 1973; Iqbal Z. *et al.*, 2016)

Diversos autores (Douglas WH. *et al.*, 1973; Thomas C. *et al.*, 1978; Quinn DM. *et al.*, 1985; Cartler GM. *et al.*, 1986) em estudos anteriores investigaram a viabilidade de desenvolvimento de um sistema de administração de fármaco, por incorporação de agentes antifúngicos ou antimicrobianos em resina acrílica de prótese (Cao Z. *et al.*, 2010; Ryalat S. *et al.*, 2011; Amin WM. *et al.*, 2009; Darwish RM. *et al.*, 2011; Salim N. *et al.*, 2012) ou nos condicionadores de tecidos (Radnai M. *et al.*, 2010; Catalán A. *et al.*, 2008; Bertolini MM. *et al.*, 2014). Estes estudos foram desenvolvidos tendo em vista uma resposta simplificada, com uma boa *compliance* por parte dos utentes, relativamente às estomatites associadas ao uso de próteses dentárias (Figueiral MH. *et al.*, 1997). Estes últimos visaram sobretudo a avaliação da eficácia dos fármacos contra a *C. albicans*, nomeadamente a Nistatina (Geerts G. *et al.*, 2008; Chow C. *et al.*, 1999; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010; Julian J. *et al.*, 2010; Chopde N. *et al.*, 2012; Falah-Tafti *et al.*, 2014; Bueno M. *et al.*, 2015), derivados do grupo azóis (Fluconazol e Itraconazol) (Chopde N. *et al.*, 2012; Falah-Tafti *et al.*, 2014; Bueno M. *et al.*, 2015; Gupta H. *et al.*, 2011), Clorhexidina (Bueno M. *et al.*, 2015; Radnai M. *et al.*, 2010; Schneid TR. *et al.*, 1992), foram relatados com diferentes graus de sucesso. (Iqbal Z. *et al.*, 2016)

Entre os agentes antifúngicos, a Nistatina constitui o medicamento mais utilizado nos estudos de Geerts G. *et al.*, 2008; Chow C. *et al.*, 1999; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010; Julian J. *et al.*, 2010; Chopde N. *et al.*, 2012; Fallah.tafti A. *et al.*, 2014; Bueno M. *et al.*, 2015; Schneid TR. *et al.*, 1992; Douglas WH. *et al.*, 1973; Thomas C. *et al.*, 1978; Truhlar MR *et al.*, 1994. Além deste composto surge também a Clorhexidina (Bueno M. *et al.*, 2015; Radnai M. *et al.*, 2010; Schneid TR. *et al.*, 1992), a Anfotericina B (Thomas C. *et al.*, 1978) e os antifúngicos da classe dos azóis. (Chow C. *et al.*, 1999; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010; Chopde N. *et al.*, 2012; Fallah.tafti A. *et al.*, 2014; Schneid TR. *et al.*, 1992)

Na literatura científica é relatado o uso de diferentes condicionadores de tecidos particularmente em estudos *in vitro*, sendo o Viscogel[®] (Geerts G. *et al.*, 2008; Chow C. *et al.*, 1999; Julian J. *et al.*, 2010; Chopde N. *et al.*, 2012; Gupta H. *et al.*, 2011; Radnai M. *et al.*, 2010; Quinn D. *et al.*, 1985; Thomas C. *et al.*, 1978; Truhlar MR. *et al.*, 1994) o mais comumente usado, seguido por GC Soft[®] (Fallah.tafti A. *et al.*, 2014; Gupta H. *et al.*, 2011), Lynam[®] (Schneid TR. *et al.*, 1992; Nam K. *et al.*, 2011), Fitt[®] (Chow C. *et al.*, 2012)

al.,1999; Quinn D. *et al.*,1985), Coe Soft ®(Chow C. *et al.*,1999) e Trusoft ® Bueno M. *et al.*, 2015). (Iqbal Z. *et al.*, 2016).

Até á data não se encontram publicações referentes ao condicionador de tecidos UFI Gel SC ® utilizado com a aplicação de fármacos para o tratamento de candidíases orais associadas ao uso continuado de próteses removíveis.

No entanto, uma série de estudos relataram o uso da combinação de Nistatina e Viscogel®. Esta combinação tem sido relatada pela estabilidade e eficácia. Contudo, a duração da eficácia permanece controversa. Diversos investigadores (Iqbal Z. *et al.*, 2016; Chow *et al.*, 1999; Falah-Tafti *et al.*, 2010) relataram a eficácia máxima da Nistatina incorporada no Viscogel® durante três dias e Geerts *et al.* durante sete dias. Bueno *et al.* determinou a concentração mínima inibitória da Clorhexidina e com eficácia relatada por até 14 dias.

Truhkar incorporou Nistatina em dois condicionadores de tecidos comercializados, o Viscogel ® e o Lynal ®, e observou que as preparações contendo maior concentração de Nistatina produziam uma maior atividade antifúngica, com uma perda rápida da mesma nos dois primeiros dias e uma estabilização nos dias seguintes. (Truhkar MR *et al.*, 1994)

No estudo de Falah-Tafti *et al.* (2010) efetuado em Acrosoft ® e usando os antifúngicos Nistatina (Iran Darou ®, Iran) e Fluconazol (Pars Darou ®, Iran) observou que a Nistatina mostrou efeitos inibitórios mais elevados do que o Fluconazol. Tal não foi verificado no presente estudo, já que o Fluconazol mostrou propriedades inibitórias superiores a todos os fármacos analisados nesta investigação. Este resultado poderá ser devido a utilização da técnica de microdiluição no estudo de Falah-Tafti por ser uma técnica menos demorada do que os métodos de agar.

Chow *et al.*, 1999, efetuaram um estudo, no qual foram incorporados a Nistatina, o Itraconazol e o Fluconazol em condicionador de tecidos para investigar a eficácia de libertação de cada fármaco, usando o método convencional em agar, medindo a sua atividade de inibição. Este estudo mostrou que o Itraconazol e Fluconazol tinham maior atividade inibitória do que a Nistatina. (Espinell-Ingroff A. *et al.*, 2005 (Falah-Tafti A. *et al.*, 2010). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na presente investigação.

Todos os derivados de grupo azóis foram eficazes contra *C. albicans* quando adicionado aos condicionadores de tecidos na globalidade dos estudos de avaliação da eficácia de fármacos em condicionadores de tecidos, com exceção de um estudo que relatou que o Itraconazol era completamente ineficaz (Gupta H. *et al.*, 2011). Esta ineficácia de Itraconazol pode dever-se à interação

química dos condicionadores de tecidos e os fármacos *per si*. Na literatura publicada a duração e estabilidade dos agentes antifúngicos adicionados aos condicionadores de tecidos permanece entre 3 e 7 dias (Chow C. *et al.*, 1999; Geerts G. *et al.*, 2008; Falah-Tafti *et al.*, 2010) ou no máximo por 14 dias. (Iqbal Z. *et al.*, 2016)

Quando testada a incorporação Clorhexidina em condicionadores de tecidos e a avaliação da sua eficácia contra a *C. albicans*, verificou-se que a Clorhexidina libertada a partir de materiais de prótese apresentou os melhores resultados de inibição, comparado com antifúngicos, como Fluconazol. (Pusateri Cr. *et al.*, 2009; Salim N. *et al.*, 2013; Redding S. *et al.*, 2009; Lamfon H. *et al.*, 2004; Bertolini MM. *et al.*, 2014)

A Nistatina utilizada no nosso estudo (Mycostatin®) tem na composição sacarose, caramelo e glicerina, que tornou a sua formulação viscosa e dificultou a sua incorporação nos poros do material condicionador de tecidos. É provável que essa tenha sido a razão pela qual o controlo isolado tenha tido resultados semelhantes aos testes com condicionador de tecidos.

Por outro lado, a Clorhexidina utilizada (Paradontax®) apresenta PEG-40 na composição. Este composto promove a molhabilidade, sendo isto benéfico na incorporação da Clorhexidina no material condicionador de tecidos e, portanto, no seu efeito antisséptico.

Num estudo de Urban VM, *et al.* (2009) afirma-se que apesar das vantagens terapêuticas, a incorporação de fármacos pode afetar as propriedades estruturais, aumentando a resistência à tração, e pode mesmo comprometer a dureza e módulo de elasticidade de vários materiais poliméricos, incluindo os condicionadores de tecidos. Acrescem ainda que as alterações na rugosidade superficial causada pela incorporação de fármacos podem permitir que a colonização bacteriana e de fungos na superfície do condicionador de tecidos.

A comparação de resultados de diferentes estudos pode tornar-se difícil devido à falta de padronização das concentrações utilizadas e composição dos fármacos. (Chow CK. *et al.*, 1999; Falah-Tafti A. *et al.*, 2010) A variabilidade nos resultados destes diferentes estudos sobre a análise dos efeitos antimicrobianos nos condicionadores de tecidos não representa, necessariamente, uma controvérsia. A expressão do antimicrobiano pode variar de acordo com o condicionador de tecido utilizado e com o contexto de apresentação da *C. albicans* (células em suspensão ou biofilme).

5.CONCLUSÕES

“Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos
modificado”

CONCLUSÕES

A incorporação de agentes antifúngicos em condicionadores de tecidos é considerado como uma opção de tratamento fiável.

Os antifúngicos podem ser adicionados aos condicionadores de tecidos temporários ou permanentes como medida terapêutica ou de prevenção de colonização microbiana.

A incorporação de fármacos antifúngicos no condicionador de tecidos teve efeito fungicida no crescimento da *C. albicans*. O Fluconazol e o Itraconazol demonstraram a melhor *performance* no teste do halo, pelo que, poderão vir a constituir a melhor escolha clínica, apesar de perderem atividade ao longo do tempo.

Podemos de igual modo concluir que pela análise estatística existe uma diferença significativamente estatística entre a incorporação de 30 segundos e 1 minuto em que a incorporação de 1 minuto é superior do ponto de vista de inibição da *C. albicans*.

O controlo de condicionador de tecidos é facilmente colonizado pela *C. albicans*, desta forma será uma vantagem a incorporação de um antifúngico no UFI Gel SC[®].

Tornam-se emergentes mais estudos clínicos a fim de esclarecer e ajudar o médico dentista no planeamento do tratamento de casos de estomatite protética recidivante.

6.LINHAS DE INVESTIGAÇÃO FUTURA

“Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos
modificado”

LINHAS DE INVESTIGAÇÃO FUTURA

De facto, os resultados desta e de outras investigações *in vitro*, embora se tenham revelado positivos, urge a necessidade de realizar ensaios onde se analisem os efeitos *in vivo* de condicionadores de tecidos modificados com antifúngicos e antimicrobianos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de um condicionador de tecidos
modificado”

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso A, Azul AM, Cruz I, Figueiredo JP, Vasconcelos L, Figueiral MH, Mota MJ, Pestane P., **Candidoses associadas ao uso de Próteses Dentárias**, *Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial*, 1993;32(2):119-121.
- Amin, W.M., Al-Ali, M.H., Salim, N.A., Al-Tarawneh, S.K. **A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis**. *Eur J Dent*. 2009;3:257–266.
- Akiba N, Hayakawa I, Keh ES, Watanabe A. **Anti-fungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst**. *J Med Dent Sci*. 2005;52(4):223–7.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M., **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. *Am J Clin Pathol*. 1966 Apr;45(4):493-6.
- Bertolini MM, Portela MB, Curvelo JA, Soares RM, Lourenço EJ, Telles DM, **Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness**. *Dent Mater*. 2014 Aug;30(8):793-8.
- Bissell V, Felix DH, Wray D. **Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the treatment of denture stomatitis**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;76(1):35–9.
- Boscato, N., Radavelli, A., Faccio, D., Loguercio, A.D. **Biofilm formation of Candida albicans on the surface of a soft denture-lining material**. *Gerodontology*. 2009;26:210–213.
- Braden M. **Tissue conditioner: I. Composition and structure**. *J Dent Res*. 1970;49(1):145-8.
- Braden M.^(a) **Tissue conditioner: II. Rheologic properties**. *J Dent Res*. 1970;49(3):496-501.
- Braden M, Causton B. **Tissue conditioner: III. Water immersion characteristics**. *J Dent Res*. 1971;50(6):1.544-7.
- Brozek, R., Koczorowski, R., Czarnecka, B. **The influence of disinfectants on elasticity of acrylic-based soft lining materials**. *Pol J Environ Stud*. 2007;16:31–38.
- Brozek, R., Rogalewicz, R., Koczorowski, R., Voelkel, A. **The influence of denture cleansers on the release of organic compounds from soft lining materials**. *J Environ Monit*. 2008;10:770–774.
- Brożek, R., Koczorowski, R., Rogalewicz, R., Voelkel, A., Czarnecka, B., Nicholson, J.W. **Effect of denture cleansers on chemical and mechanical behavior of selected soft lining materials**. *Dent Mater*. 2011;27:281–290.

- Bueno M, Urban V, Barbe' rio G, Silva W, Porto V, Pinto L, et al. **Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the Candida albicans biofilm.** Oral Dis 2015;21:57–65.
- Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Banon-Clement JM, Baehni P. **Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects.** Oral Dis. 1996;2(4):285–90.
- Cao, Z., Sun, X., Yeh, C.K., Sun, Y. **Rechargeable infection-responsive antifungal denture materials.** J Dent Res. 2010;89:1517–1521.
- Carter GM, Kerr MA, Shepherd MG, **The rationell management of oral condidoses associated with dentures.** New Zealand Dent J. 1986;82:81-4
- Catalán, A., Pacheco, J.G., Martínez, A., Mondaca, M.A. **In vitro and in vivo activity of Melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on Candida albicans.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;105:327–332.
- Chander S, Hill M, Moore D, Morrow L. **Tissue conditioning materials as functional impression materials.** Eur J Prosthodont Restor Dent. 2007;15(2):67–71.
- Chopde N, Pharande A, Khade MN, Khadtare YR, Shah SS, Apratim A. **In vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against Candida albicans.** J Contemp Dent Pract 2012;13:695–8.
- Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. **Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis.** Gerodontology. 1999;16(2):110–8.
- CROWDER, M.J. & HAND, D.J. **Analysis of repeated measures.** London: Chapman & Hall, 1990, 256p
- Dar MS, Sreedar G, Shukla A, Gupta P, Rehan AD, George J. **An in vitro study of antifungal drug susceptibility of Candida species isolated from human immunodeficiency virus seropositive and human immunodeficiency virus seronegative individuals in Lucknow population Uttar Pradesh.** Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP. 2015;19(2):205-211.
- Darwish, R.M., Amin, W.M., Al-Ali, M.H., Salem, N.A. **Study of the elution of fluconazole from a self-polymerizing acrylic resin and its activity against resistant Candida albicans.** J Mater Sci Mater Med. 2011;22:1885–1890.
- Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. **1:6-Di-4'- chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency.** Br J Pharmacol Chemother 1954;9:192-6.
- Denton GW. **Chlorhexidine.** In: Block SS, editor. Disinfection, Sterilization and Preservation. 4 th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1991. p. 274-89.
- DIGGLE, P.J. **An approach to the analysis of repeated measurements.** Biometrics, v.44, p.959-971, 1988.

- Douglas WH, Walter DM, **Nystatin in denture liners – an alternative treatment of enture stomatitis**. Br Dent J 1973;135:55-9
- Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, Pfaller M, et al., . **Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution susceptibility method (M 38-A document) for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole**. J Clin Microbiol.2005;43(10):5243–6
- Epstein JB, Gorsky M, Caldwell J. **Fluconazole mouthrinses for oral candidiasis in postirradiation, transplant, and other patients**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93:671-5
- Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. **Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile**. J Oral Pathol Med. 2003;32(10):571–5.
- Falah-Tafti A1, Jafari AA, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Hayan RS. **A Comparison of the eEfficacy of Nystatin and Fluconazole Incorporated into Tissue Conditioner on the In Vitro Attachment and Colonization of Candida Albicans**. Dent Res J (Isfahan). 2010 Winter;7(1):18-22.
- Fallah-tafti A, Jafari A, Mirzaeiipoorm L, Ashoori H. **Stability and duration of antifungal effects of nystatin and fluconazole mixed with a tissue conditioner on colonization of Candida albicans (in vitro)**. Res Dent Sci 2014;11:21–6.
- Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, et al., . **Predictive value of oral colonization by Candida yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients**. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 2):223–8
- Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. **Oral fungal infections: an update for the general practitioner**. Australian dental journal. 2010;55Suppl 1:48-54.
- Field, A. (2000). **Discovering statistics using SPSS for Windows** [Cap. 9]. London: Sage.
- Figueiral MH, Azul AM, Cruz I, Nunes JM, Meireles B., **Utilização de um agente antimicrobiano para reduzir a contaminação dos condicionadores de tecido em prótese removíveis. Estudo comparativo**. Stoma, 1997 Junho;43:43-45
- Garcia-Cuesta C., Maria-Gracia Sarrion-Pérez, Jose V. Bagán, **Current treatment of oral candidiasis: A literature review**. J Clin Exp Dent. 2014 Dec; 6(5): e576–e582.
- Geerts G, Stuhlinger M, Basson N. **Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study**. J Oral Rehabil 2008;35: 664–9.
- Goins RA, Ascher D, Waecker N, Arnold J, Moorefield E. **Compa–rison of fluconazole and nystatin oral suspensions for treatment of oral candidiasis in infants**. Pediatr Infect Dis J. 2002;21:1165-7

- Graybill JR, Vazquez J, Darouiche RO, Morhart R, Greenspan D, Tuazon C, Wheat LJ, Carey J, Leviton I, Hewitt RG, MacGregor RR, Valenti W, Restrepo M, Moskovitz BL. **Randomized trial of itraconazole oral solution for oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients.** Am J Med 1998. 104:33–39.
- Gupta H, Bhat A, Prasad K, Kumar V. **An innovative method of incorporating antifungal agents into tissue conditioners: an in vitro study.** Trends Biomater Artif Organs 2011;25: 63–6.
- He H, Cong Y, Yang H, Dong Y. **Mutative expression in Candida albicans infection and cytokine signaling network in gene knockout mice.** European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2010;29(8):99-6.
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. **Candida species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used.** Critical reviews in microbiology. 2006;32(4):217-26.
- Hugo WB, Longworth AR. **The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.** J Pharm Pharmacol 1966;18:569-78.
- Iqbal Z, Zafar MS., **Role of antifungal medicaments added to tissue conditioners: A systematic review.** J Prosthodont Res. 2016 Apr 13. pii: S1883-1958(16)30018-4.
- J. Carrillo-Muñoz, G. Quindós, C. Tur, M. T. Ruesga, Y. Miranda, O. del Valle, P. A. Cossum, and T. L. Wallace, **In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole.** J. Antimicrob. Chemother. (1999) 44 (3): 397-401
- Jones CG. **Chlorhexidine: Is it still the gold standard?** Periodontol 2000 1997;15:55-62
- Julian J, Sunil S, Baby GG. **Efficacy of tissue conditioner acting as effective fungicidal drug delivery system – an in vitro study.** Oral Maxillofac Pathol J 2010;1.
- Kulak Y, Kadir T. **in vitro study of fungal presence and growth on three tissue conditioner materials.** J Marmara Univ Dent Fac. 1997;2(4):682–4.
- Lalla RV, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. **Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies.** Journal of the California Dental Association. 2009;41(4):263-8.

- Lamfon, H., Porter, S.R., McCullough, M., Pratten, J. **Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study.** J Antimicrob Chemother. 2004;53:383–385.
- Lefebvre JL, Domenge C; Study Group of Mucositis, **A comparative study of the efficacy and safety of fluconazole oral suspension and amphotericin B oral suspension in cancer patients with mucositis.** Oral Oncol. 2002 Jun;38(4):337-42.
- Lindhe J, Karring T, Lang NP. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry.** 4 th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 106-49.
- Loe H, Schiött CR, Karring G, Karring T. **Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects.** J Periodontal Res 1976;11:135-44.
- Loe H, Schiött CR. **The effect of mouthrinse and topical application of Chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man.** J Periodontol Res 1970;5:79-83.
- M.C. Arendrup, J. Meletiadis, J.W. Mouton, J. Guinea, M. Cuenca-Estrella, K. Lagrou S.J. **EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents.** June 2016 Volume 22, Issue 6, Pages 571.e1–571.e4
- Mackenzie IC, Nuki K, Loe H, Schiött CR. **Two years oral use of chlorhexidine in man. V. Effects on stratum corneum of oral mucosa.** J Periodontal Res 1976;11:165-71.
- Marra J., et al., ., **Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation,** J Appl Oral Sci., 2012;20(6):643-8
- McCullough MJ, Savage NW. **Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry.** Australian dental journal. 2005;50(4 Suppl 2):S36-9.
- Monsenego, P. **Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study “in vivo”.** J Oral Rehabil. 2000;27:708–713.
- Nair RG, Samaranayake LP. **The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An in vitro study.** APMIS. 1996;104:339-49.
- Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. ***Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity.** Microbes and infection / Institut Pasteur. 2011;9(12-9):963-76.
- Newton AV, **Denture sore mouth: a possible aetiology.** Br Dent J 1962;112:357-360
- Nikawa, H., Jin, C., Makihira, S., Egusa, H., Hamada, T., Kumagai, H. **Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro.** J Oral Rehabil. 2003;30:243–250.

- Pisani MX, Malheiros-Segundo AD, Balbimo KL, Souza RD, Paranhos HD, Lovato da Silva CH. **Oral Health related quality of life edentulous patients after denture relining with a silicone-based soft liner.** Gerodontology 2012;29:474-80
- Pitsouni E, Iavazzo C, Falagas ME. **Itraconazole vs fluconazole for the treatment of uncomplicated acute vaginal and vulvovaginal candidiasis in nonpregnant women: a metaanalysis of randomized controlled trials.** Am J Obstet Gynecol 2008;198:153–160.
- Pusateri, C.R., Monaco, E.A., Edgerton, M. **Sensitivity of Candida albicans biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine.** Arch Oral Biol. 2009;54:588–594.
- Quinn DM. **The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of Candida albicans.** J Oral Rehabil. 1985;12(2):177–82.
- Radnai, M., Whiley, R., Friel, T., Wright, P.S. **Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of Candida albicans.** Gerodontology. 2010;27:292–296.
- Rao NG, Han G, Greene JN, Tanvetyanon T, Kish JA, De Conti RC, Chuong MD, Shridhar R, Biagioli MC, Caudell JJ, Trotti AM. **Effect of prophylactic fluconazole on oral mucositis and candidiasis during radiation therapy for head-and-neck cancer.** Pract Radiat Oncol. 2013 Jul-Sep;3(3):229-33.
- Rautemaa R, Ramage G. **Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. Critical reviews in microbiology.** 2011;37(4):328-36.
- Redding, S., Bhatt, B., Rawls, H.R., Siegel, G., Scott, K., Lopez-Ribot, J. **Inhibition of Candida albicans biofilm formation on denture material.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107:669–672.
- Rocha DM., et al., , **In vitro evaluation of three temporary tissue conditioners submitted to penetration tests,** RSBO v. 6, n. 1, 2009
- Ronanki S, Kulkarni S, Hemalatha R, Kumar M, Reddy P., **Efficacy of commercially available chlorhexidine mouthrinses against specific oral microflora.** Indian J Dent Res. 2016 Jan-Feb;27(1):48-53.
- Rueggeberg F. **From vulcanite vinyl. A history of resins in restorative dentistry.** J. Prosthet Dent. 2002;87:364-79
- Ryalat, S., Darwish, R., Amin, W. **New form of administering chlorhexidine for treatment of denture-induced stomatitis.** Ther Clin Risk Manag. 2011;7:219–225.
- Salim, N., Moore, C., Silikas, N., Satterthwaite, J.D., Rautemaa, R. **Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days.** J Dent. 2012;40:506–512.

- Salim, N., Silikas, N., Satterthwaite, J.D., Moore, C., Ramage, G., Rautemaa, R. **Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated polymer against Candida albicans biofilm formation.** Int J Antimicrob Agents. 2013;41:193–196.
- Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB. **A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine.** J Periodontal Res 1986;21:23-32.
- Schneid TR. **An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis.** Spec Care Dent 1992;12:245–50.
- Schroeder HE. **Formation and Inhibition of Dental Calculus.** J Periodontol 1969;40:643-6.
- Sharma S., **Comparative Evaluation of Antifungal Activity of Melaleuca Oil and Fluconazole when Incorporated in Tissue Conditioner: An In Vitro Study,** Journal of Prosthodontics 23 (2014) 367–373 C _ 2014
- Sholapurkar AA, Pai KM, Rao S. **Comparison of efficacy of flu-conazole mouthrinse and clotrimazole mouthpaint in the treatment of oral candidiasis.** Aust Dent J. 2009;54:341-6.
- Silva S, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper SJ, et al., . **Characterization of Candida parapsilosis infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium.** European journal of oral sciences. 2009;117(6):669-75.
- Skupien JA et al., ., **Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: A systematic review,** J Prosthet Dent. 2013 Nov;110(5):356-62. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.003. Epub 2013 Aug 30.
- Srivatstava A, Ginpall K, Perampalli NU, Bhat N, Ballal M, **Evaluation of the properties of a tissue conditioner containing organum oil as an antifungal additive.** J Prosthet Dent. 2013 Oct;110(4):313-9. doi: 10.1016/S0022-3913(13)60381-9.
- Taillandier J, Esnault Y, Alemanni M. **A comparison of fluconazole oral suspension and amphotericin B oral suspension in older patients with oropharyngeal candidosis.** Multicentre Study Group. Age Age-ing. 2000;29:117-23.
- Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. **Molecular and cellular mechanisms that lead to Candida biofilm formation.** Journal of dental research. 2009;88(2):105-15.
- Thomas C, Nutt G. **The in vitro fungal properties of visco-gel, alone and combined with nystatin and smphotericin B.** J oral Rehabil 1978;5;167-72
- Toda C, Mendoza Marin DO, Rodriguez LS, Paleari AG, Pero AC, Compagnoni MA., **Antimicrobial activity of a tissue conditioner combined with a biocide polymer.** J Contemp Dent Pract. 2015 Feb 1;16(2):101-6.

- Urban VM, et al., ., **Superficial Distribution and Identification of Antifungal/Antimicrobial Agents on a Modified Tissue Conditioner by SEM-EDS Microanalysis: A Preliminary Study**, Journal of Prosthodontics 18 (2009) 603–610, 2009
- Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. **Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses**. J Clin Periodontol 2005;32:305-9.
- Vanden Abbeele, A., de Meel, H., Ahariz, M., Perraudin, J.P., Beyer, I., Courtois, P. **Denture contamination by yeasts in the elderly**. Gerodontology. 2008;25:222–228.
- Waters MG, Williams DW, Jagger RG, Lewis MA. **Adherence of Candida albicans to experimental denture soft lining materials**. J Prosthet Dent. 1997;77(3):306–12.
- Wilcox CM, Darouiche RO, Laine L, Moskovitz BL, Mallegol I, Wu J. **A randomized, double blind comparison of itraconazole oral solution and fluconazole tablets in the treatment of esophageal candidiasis**. The Journal of infectious diseases 1997.
- Wilson J. **The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis**. Br Dent J. 1998;185(8):380–4.
- Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, Cruz NC. **Adherence *in vitro* of Candida albicans to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle**. Arch Oral Biol. 2010;55:763-70.
- Zijlstra V. et al., ., **Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth**, PLoS One. 2010; 5(2): e9321.